



**VYSOKÁ ŠKOLA BÁŇSKÁ - TECHNICKÁ UNIVERZITA
OSTRAVA UNIVERZITNÍ STUDIJNÍ PROGRAMY**

**Návrh nanokompozitního materiálu pro přípravu
biliárních stentů**

Design of nanocomposite material for a preparation of
the biliary stents

Jméno studenta:

Petr Hlinka

Vedoucí bakalářské práce:

doc. Ing. Daniela Plachá, Ph.D.

Ostrava 2016

Zadání bakalářské práce

Student: **Petr Hlinka**
Studijní program: B3942 Nanotechnologie
Studijní obor: 3942R001 Nanotechnologie
Téma: **Návrh nanokompozitního materiálu pro přípravu biliárních stentů**
Design of nanocomposite material for a preparation of the biliary stents
Jazyk vypracování: čeština

Zásady pro vypracování:

V rámci bakalářské práce bude provedena literární rešerše v oblasti problematiky biliárních stentů, které se využívají zejména v léčbě hepatobiliárních tumorů. Cílem práce je návrh nového materiálu na bázi nanokompozitního polymeru, který zlepšuje vlastnosti stentu a prodlužuje délku života pacientů. Teoretická část bude zaměřena na studium biologických procesů probíhajících ve žlučovodu, na studium problematiky biliárních stentů a nových materiálů na bázi nanokompozitních polymerů. V praktické části bude navržen, připraven a charakterizován polymerní nanokompozitní materiál.

Seznam doporučené odborné literatury:

I. Huibregtse, P. Fockens. Plastic Biliary Stents for Malignant Biliary Diseases. *Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America*, 21, 3, (2011) 435-445.

U. Weickert, F. Wiesend, T. Subkowski, A. Eickhoff, G. Reiss. Optimizing biliary stent patency by coating with hydrophobin alone or hydrophobin and antibiotics or heparin: an in vitro proof of principle study. *Advances in Medical Sciences*, 56, 2 (2011) 138-144.

ASGE Technology Assessment Committee. Pancreatic and biliary stents. *Gastrointestinal Endoscopy*, 77, 3 (2013) 319-327.

E.W. McAllister, L.C. Carey, P.G. Brady, R. Heller, S.G. Kovacs. The role of polymeric surface smoothness of biliary stents in bacterial adherence, biofilm deposition, and stent occlusion. *Gastrointestinal Endoscopy*, 39, 3 (1993) 422-425.


Q. Yu, Z. Wu, H. Chen. Dual-function antibacterial surfaces for biomedical applications. *Acta Biomaterialia*, 16 (2015) 1-13.

Formální náležitosti a rozsah bakalářské práce stanoví pokyny pro vypracování zveřejněné na webových stránkách fakulty.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Daniela Plachá, Ph.D.**


Datum zadání: 20. 10. 2015

Datum odevzdání: 16. 05. 2016



prof. Ing. Jaromír Pištora, CSc.
vedoucí katedry





prof. Ing. Petr Noskievič, CSc.
prorektor pro studium

Místopřísežné prohlášení:

Prohlašuji, že jsem celou bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a uvedla jsem všechny použité podklady a literaturu.

V Ostravě 16. 5. 2016

Podpis studenta:

.....*Petra Klícká*.....

Prohlašuji, že

- jsem celou bakalářskou práci, včetně příloh, vypracoval samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a uvedl jsem všechny použité podklady a literaturu,
- byl jsem seznámen s tím, že na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. – autorský zákon, zejména §35 – užití díla v rámci občanských a náboženských obřadů, v rámci školních představení a užití díla školního a §60 – školní dílo,
- беру на ве́домі, же Высoкá škola báňská – Technická univerzita Ostrava (dále jen VŠB-TUO) má právo nevýdělečně ke své vnitřní potřebě bakalářskou práci užít (§35 odst. 3),
- souhlasím s tím, že jeden výtisk bakalářské práce bude uložen v Ústřední knihovně VŠB-TUO k prezenčnímu nahlédnutí a jeden výtisk bude uložen u vedoucího bakalářské práce. Souhlasím s tím, že údaje o bakalářské práci, obsažené v Záznamu o závěrečné práci, umístěném v příloze mé bakalářské práce, budou zveřejněny v informačním systému VŠB-TUO,
- bylo sjednáno, že s VŠB-TUO, v případě zájmu z její strany, uzavřu licenční smlouvu s oprávněním užít dílo v rozsahu §12 odst. 4 autorského zákona,
- bylo sjednáno, že užít své dílo – bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití mohu jen se souhlasem VŠB-TUO, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly VŠB-TUO na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše),
- беру на ве́домі, же оdevzdáním své práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, bez ohledu na výsledek její obhajoby.

V Ostravě : 16.5.2016



podpis studenta

Jméno studenta: Petr Hlinka

Adresa trvalého pobytu autora práce: Budovatelů 909, Havířov – Prostřední Suchá 735 64

Poděkování:

Tato bakalářská práce vznikla za podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky, při řešení projektu SP 2016/75 Nanokompozity s antibakteriálními vlastnostmi, VŠB-TU Ostrava a za podpory Národního programu udržitelnosti II (NPU II) v rámci projektu „IT4Innovations excellence in science - LQ1602“ a rovněž projektu č. LO1203 "Regionální materiálově technologické výzkumné centrum – Program Udržitelnosti.

Chtěl bych poděkovat především paní doc. Ing. Daniele Plaché, Ph.D. za spolupráci a pomoc při řešení této bakalářské práce a také všem pracovníkům VŠB-TUO za provedení všech potřebných analýz.

Anotace

Tato bakalářská práce je zaměřena na studium a návrh nových nanokompozitních materiálů, které by bylo možné využít při přípravě biliárních stentů. Pro přípravu nanokompozitního materiálu byly vybrány dva polymery – polyethylenoxid a polyvinylacetát. Tyto polymery byly modifikovány vermikulitem nebo uhlíkatými nanotrubičkami. Struktura připravených vzorků byla charakterizována pomocí světelného digitálního mikroskopu a skenovacího elektronového mikroskopu. Jejich antimikrobiální vlastnosti byly ověřeny provedením antimikrobiálních testů.

Hlinka, Petr. *Návrh nanokompozitního materiálu pro přípravu biliárních stentů*. Ostrava, 2016. Bakalářská práce. VŠB – Technická univerzita Ostrava. Univerzitní studijní programy.

Anotation

This bachelor thesis is focused on studying and designing new nanocomposite materials, which could be used as a material for biliary stents. For the preparation two polymers were chosen – polyethylene oxide and polyvinylacetate. The polymers were modified by vermiculite or by carbon nanotubes. Structure of prepared samples was analysed by light digital microscope and scanning electron microscope. Antimicrobial properties of prepared samples were tested by antimicrobial assay.

Hlinka, Petr. *Design of nanocomposite material for a preparation of the biliary stents*. Ostrava, 2016. Bachelor thesis. VŠB – Technical university Ostrava. University study programs.

Obsah

Seznam zkratek	10
Úvod	11
Teoretická část	
1. Problematika žlučových cest	12
1.1 Žlučový	12
1.2 Onemocnění žlučových cest.....	13
1.3 Žlučové stenty	14
1.3.1 Mechanismus vzniku biofilmu	17
1.3.2 Metody modifikace povrchu žlučového stentu.....	19
2. Typy antibakteriálních povrchů	22
2.1 Materiály na bázi nanokompozitních polymerů	24
2.1.1 Transformace hydrofilního polymeru pomocí uhlíkatých nanotrubiček	24
2.1.2 Stříbro/titan/chitosan adipát nanokompozit	25
2.1.3 Stříbro/polymer nanokompozity	26
Praktická část	
3. Použité materiály, přístroje a postupy	29
3.1 Použité materiály	29
3.2 Použité přístroje	29
3.3 Metody charakterizace připravených materiálů	30
3.3.1 Analýza uhlíku.....	30
3.3.2 FTIR	30

3.3.3 Světelný digitální mikroskop.....	30
3.3.4 SEM.....	30
3.3.5 Antimikrobiální testy.....	31
4. Připravené materiály	31
4.1 Modifikace jílů	31
4.2 Uhlíkaté nanotrubičky.....	32
4.2.1 Čištění uhlíkatých nanotrubiček.....	32
4.2.2 Modifikace uhlíkatých nanotrubiček	32
4.3 Polymerní vrstvy	32
4.3.1 Příprava polyethylenoxidových vrstev	32
4.3.2 Příprava polyvinylacetátových vrstev	34
5. Výsledky a diskuze.....	34
Závěr	46
Literatura.....	47

Seznam zkratek

CFU – colony forming units

FTIR – Fourier transform infrared spectroscopy

HDP - Hexadecylpyridiniumchlorid

HDTMA - Hexadecyltrimethylamoniumbromid

SEM – skenovací elektronová mikroskopie

Úvod

Cílem bakalářské práce je návrh nanokompozitního polymerního materiálu s využitím antibakteriálních plniv na bázi modifikovaných jílových minerálů a uhlíkatých nanotrubiček pro přípravu stentů a ověření jejich antimikrobiálních vlastností na vybraných bakteriálních kmenech.

Cílem teoretické části této práce je zpracování literární rešerše zabývající se problematikou onemocnění žlučových cest, žlučových stentů a antimikrobiálních materiálů. Léčba onemocnění žlučových cest pomocí žlučových stentů je v současné době velice komplikovaná. Žlučové stenty se dělí do dvou základních skupin, plastové stenty a samoexpandabilní kovové stenty. U běžně používaných plastových stentů dochází přibližně po třech měsících k ucpání vlivem vzniklého biofilmu. Pacientův život je tímto ohrožen a musí podstoupit další operaci, které by se mohl vyhnout, kdyby měly stenty delší životnost. Samoexpandabilní kovové stenty mají delší životnost, ale jsou mnohem dražší. Existuje mnoho typů stentů, ale žádný nevykazuje prodlouženou životnost. Studium dosavadních metod modifikace žlučových stentů a antimikrobiálních povrchů používaných v jiných oborech byly vybrány materiály pro použití v praktické části.

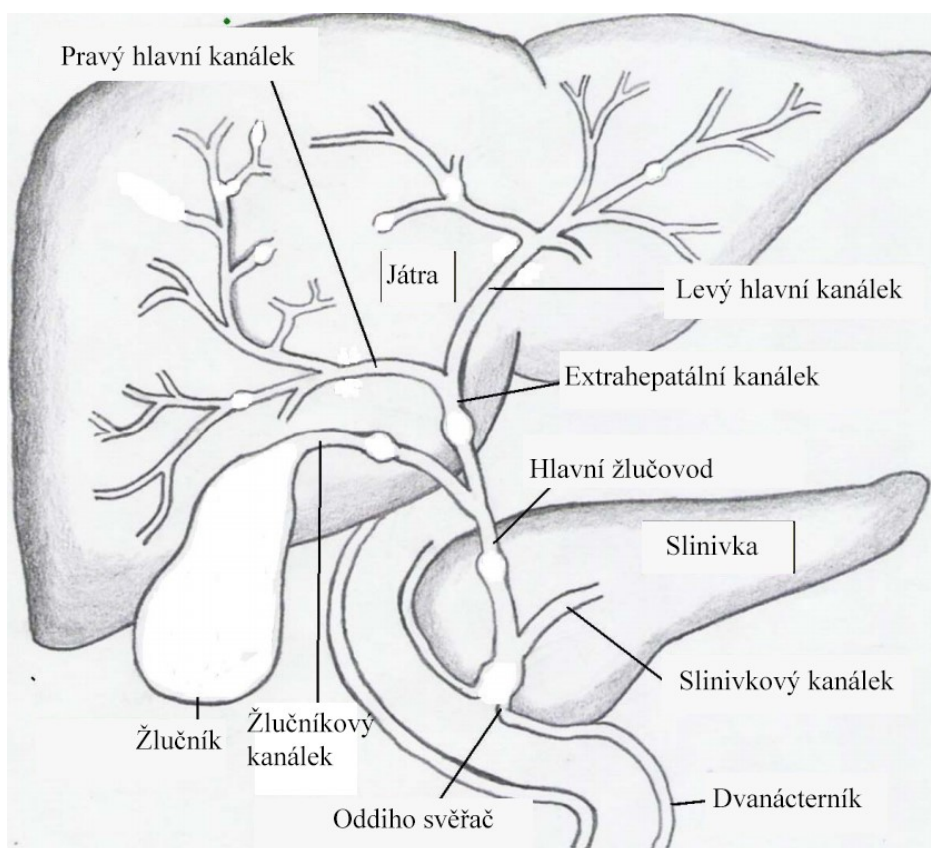
Cílem praktické části je výroba modifikovaných polymerních vrstev ze dvou různých polymerů, polyethylenoxidu a polyvinylacetátu, charakterizace jejich struktury a antimikrobiálních vlastností. Polyethylenoxid díky své struktuře dobře přijímá modifikující látky a polyvinylacetát byl vybrán díky svým biodegradabilním vlastnostem, které by bylo možné využít při krátkodobých onemocněních žlučových cest, bez nutnosti stent vyjmout z těla pacienta, po skončení léčby. Jako modifikující látky byly vybrány HDP a HDTMA, vzhledem k výborným antibakteriálním vlastnostem kvartérních amoniových skupin. Jako nosič kvartérních amoniových skupin byly použity uhlíkaté nanotrubičky a vermikulit.

Teoretická část

1. Problematika žlučových cest

1.1 Žlučovod

Žlučové cesty jsou komplexním systémem kanálků, viz obrázek 1. V játrech začínají žlučovými kapilárami, což jsou prostory mezi jaterními buňkami. Do těchto prostor je produkována žluč. Tyto kapiláry přechází do Heringových kanálků, které postupně srůstají a tvoří interlobulární, septální a hlavní kanálky. Srůstem hlavních kanálků vzniká extrahepatální kanálek, který je zhruba 4 cm dlouhý a 4 mm široký. Je propojen se žlučníkem přes žlučníkový kanálek, který je dlouhý 3-4 cm a 3 mm široký, nachází se v něm spirální chlopeň. Výslednou strukturu označujeme jako hlavní žlučovod. Ten má délku 7,5-11 cm a průměr 6-8 mm. Hlavní žlučovod je před vstupem do tlustého střeva opatřen Oddiho svěračem, který reguluje průtok žluči do střeva a zabraňuje vstupu obsahu střeva do žlučovodu [1, 2].



Obrázek 1: Struktura žlučových cest [3]

Povrch žlučových cest je tvořen cholangiocyty. Cholangiocyty jsou morfologicky, heterogenní podle funkcí, které plní v různých částech žlučových cest. Kromě odvodu žluči do

střeva, se cholangiocyty podílí i na tvorbě žluči. Mají absorpční i sekreční funkci a také regenerační a opravnou funkci. Z celkového množství až 40 % žluči je vytvořeno v kanálcích žlučových cest. Sekreční funkci mají hlavně cholangiocyty v interlobulárních, septálních a hlavních kanálcích, protože mají vhodné hormonální receptory a dobrou schopnost transportovat ionty v polarizovaných doménách plazmové membrány. Ostatní biologické vlastnosti jsou charakteristické pro nejmenší části žlučových cest (terminální cholangiocyty a Heringovy kanálky). Jedná se o plasticitu, reaktivitu a schopnost chovat se jako zakladatelské jaterní buňky. Schopnost chovat se jako zakladatelské buňky lze pozorovat pouze při značném poškození jater [1].

Tvorba žluči je komplexní proces, na kterém se podílí hepatocyty i cholangiocyty. Hepatocyty produkují primární žluč, která je dále upravována cholangiocyty. Cholangiocyty pomocí sekrečních a absorpčních procesů ovlivňují průtok žluči a její zásaditost podle fyziologických potřeb. Tyto procesy jsou regulovány širokou škálou hormonů. Cholangiocyty absorbují, některé složky žluči, jako je glukóza nebo glutathion, který je potřebný k detoxifikačním procesům v játrech, a podílí se také na cirkulaci žlučových solí, čímž jsou schopny ovlivnit sekreci žluči. Cholangiocyty se také podílí na cirkulaci žlučových solí tím, že jsou schopny absorbovat žlučové kyseliny a poté je znovu uvolnit [1].

1.2 Onemocnění žlučových cest

Nejčastějším onemocněním žlučových cest je obstrukce, kdy je zabráněno normálnímu toku žluči. To má za následek mnoho zdravotních komplikací. K obstrukci může dojít z mnoha příčin, patří mezi ně například:

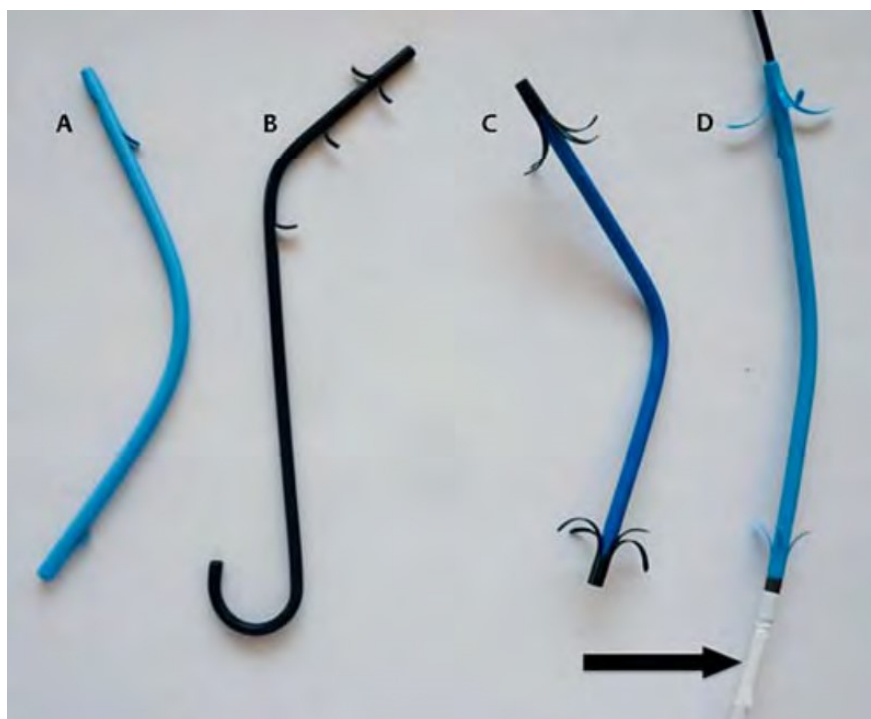
- žlučové kameny, které vznikají ve žlučníku,
- zánět žlučovodu nebo jater,
- cysta,
- zvětšení lymfatických uzlin,
- pankreatitida, zánět slinivky břišní,
- nádory žlučových cest, nebo slinivky břišní,
- metastáze v břišní dutině zasahující až do žlučových cest,
- cirhóza jater [4].

Mezi rizikové faktory vzniku obstrukce patří předchozí zdravotní stav, chronické záněty žlučových cest a slinivky břišní, prodělaná nádorová onemocnění břišní dutiny, obezita. Příznaky obstrukce jsou tmavá moč, svědění, světlá stolice, průjem, zvracení, ztráta váhy, horečka, nažloutlá pokožka nebo oči, bolest v pravé části břicha. Diagnózu je možné stanovit pomocí krevních testů, ultrazvuku, rentgenu, magnetické rezonance nebo endoskopického vyšetření, kdy je do pacienta zavedena sonda, která dokáže dokumentovat stav žlučových cest a odbírat vzorky. K léčbě obstrukce se používá žlučový stent [5].

1.3 Žlučové stenty

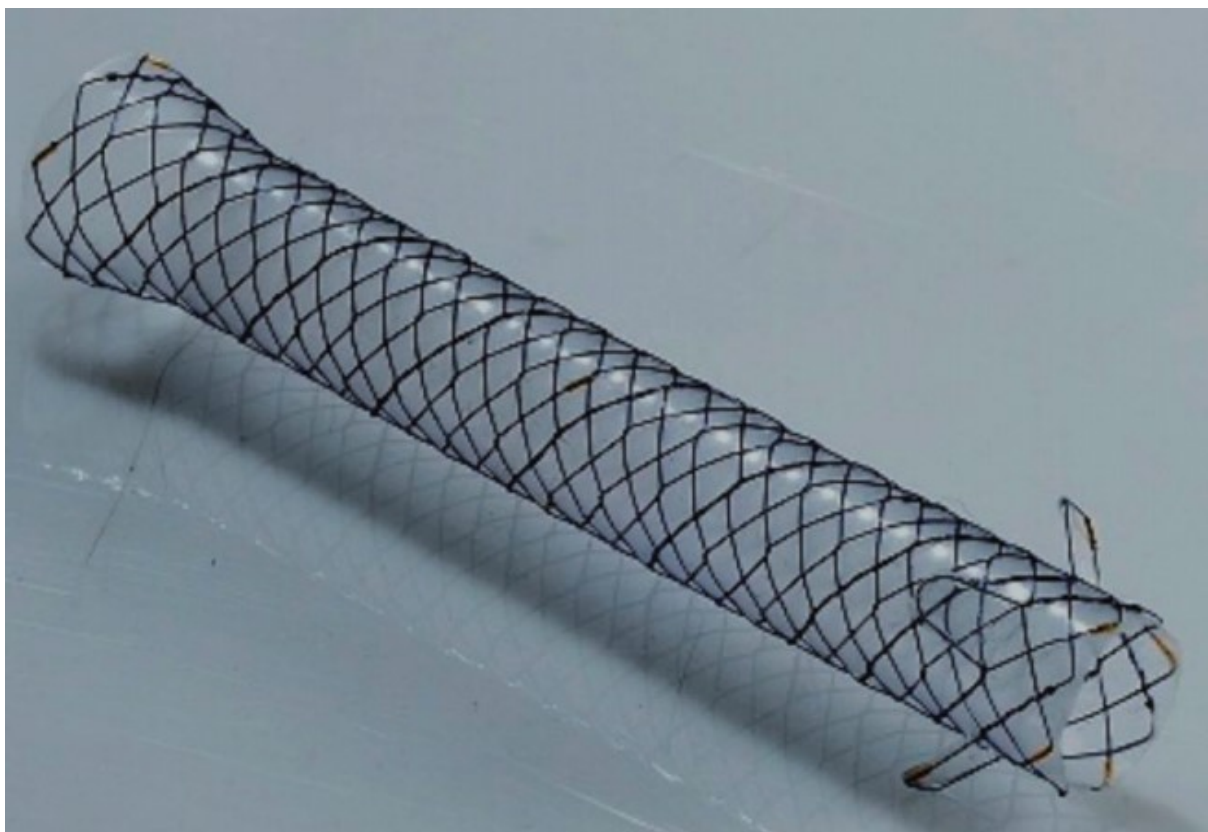
Žlučové stenty jsou plastové nebo kovové tubulární zařízení, které se primárně využívají ke zprůchodnění ucpaného žlučodu. Mohou se také využívat při léčbě trhliny v žlučodu nebo jako prevence proti pooperační pankreatitidě [6].

Plastové žlučové stenty jsou nejčastěji tvořeny polyethylenem, polyurethanem nebo teflonem. Délka stentu se pohybuje v rozmezí 1 až 18 cm a jeho průměr od 1,7 do 4 mm. Limitujícím faktorem průměru plastových stentů je maximální možný průměr zařízení pomocí kterého je stent zaváděn do těla pacienta. V současné době je k dispozici více druhů plastových stentů, viz obrázek 2. Například pigtail stenty mají stočený jeden nebo oba konce a ve stočených částech mají postranní díry. Přírubové stenty mohou být rovné nebo zakřivené a mají zpětné klapky. Některé stenty mají i chlopeň, která nahrazuje funkci Oddiho svěrače. Povrch stentů je často modifikován za účelem zvýšení životnosti. Doposud nebyly publikovány žádné studie s dostatkem dat, které by potvrdily zvýšenou životnost upravených stentů. Aby bylo možné stenty monitorovat, jsou stenty upraveny tak, aby byly nepropustné pro záření. To znamená, že jsou viditelné například na rentgenových snímcích. Průměrná cena se u plastových stentů pohybuje okolo 2 tisíc korun [6].



Obrázek 2: A – stent s postranními děrami a zpětnými klapkami (Cotton-Leung stent), B – stent tvaru S (Endoflex stent), C – stent bez postranních děr se zpětnými klapkami (Olympus) D – stent bez postranních děr se zpětnými klapkami a chlopní (Cook endoscopy) [7]

Kovové samoexpandabilní žlučovodné stenty (viz obrázek 3) mají daleko větší průměr. Při zavádění jsou v pouzdře a k rozvinutí dojde až v žlučovodu po odstranění pouzdra. Vzhledem k většímu průměru mají delší životnost. Jsou vyráběny z různých kovových slitin, například z nitinolu (nikl + titan) nebo z elgiloye (kobalt + chrom + nikl). Délka kovových stentů se pohybuje v rozmezí 4 až 12 cm a průměr od 6 do 10 mm. Průměrná cena kovových stentů se pohybuje okolo 30 tisíců korun. Kovové stenty jsou také viditelné na rentgenových snímcích. Jejich konce jsou uzpůsobeny tak aby zabránily migraci. Kovové stenty mohou být pokryté, částečně pokryté a nepokryté. K pokrytí stentu se většinou využívá polytetrafluorethylen nebo silikonové membrány. Nepokryté stenty je těžké vyjmout, protože dochází k vrůstu nádoru nebo tkáně do struktury stentu. Částečně pokryté stenty a úplně pokryté stenty je možné přemístit nebo vyjmout [6, 8].



Obrázek 3: Pokrytý kovový samoexpandabilní stent se zpětnými klapkami [9]

Použitím stentů u pacientů trpících zhoubným nádorem žlučových cest se zlepšuje jejich stav. Dochází k ústupu žloutenky, anorexie a svědění. Při použití plastových stentů se jejich životnost prodlužuje s narůstajícím průměrem, nebyl však, zaznamenán rozdíl mezi stenty s průměrem 3,33 mm, 3,83 mm a 4 mm. K ucpání plastového stentu dochází přibližně kolem 3 až 6tého měsíce. Kovové stenty mají delší životnost, ale nejsou ekonomicky výhodné u terminálních pacientů s rozsáhlými metastázemi. Kovové stenty se tradičně využívají při léčbě pacientů s neoperovatelným jaterním nebo žlučníkovým nádorem [6, 10].

Léčba nezhoubných žlučovodných zúženin pomocí stentů je velice úspěšná. Nezhoubné žlučovodné zúženiny mohou být důsledkem pooperačního zranění nebo důsledkem chronického zánětlivého onemocnění. Při léčbě pooperačních zúženin jsou stenty úspěšnější než při léčbě chronických zánětů, kde často dochází k opětovnému vzniku zúženiny. Nepokryté kovové stenty se téměř nepoužívají z důvodu obtížného odstranění [6].

Při pooperační léčbě natrženého žlučovodu dosahuje úspěšnost léčby plastovým stentem 70 -100 %. Při léčbě velkých komplexních trhlin kdy byla léčba plastovým stentem neúspěšná se využívají částečně nebo úplně pokryté kovové stenty. Stenty mohou být také využity při léčbě žlučových kamenů. Například u pacientů s více velkými žlučovými kameny, které

nemohou být odstraněny jinou metodou. Dočasným umístěním plastového stentů dochází k redukci množství a velikosti kamenů a umožňují úplné vyčištění u více jak 90 % pacientů. Podobných výsledků je možno dosáhnout s pokrytými kovovými stenty [6].

Výzkumy životnosti plastových stentů neprokázaly nadřazenost žádného typu plastových stentů. Studium životnosti stentů je náročné, často dochází k získání protichůdných dat, kdy se při jednom experimentu prokáží určité vlastnosti a při druhém se prokáží vlastnosti opačné. Při porovnání kovových a plastových stentů je jediným rozdílem, že u kovových stentů dochází k ucpávání pomaleji [6].

Dvě největší bezpečnostní rizika u plastových stentů jsou migrace a ucpávání. Ve vzácných případech může migrace stentu způsobit protržení střeva. K ucpání dochází u všech stentů, pravděpodobnost narůstá s časem. Při nedostatečném proudění žluči může dojít k akutní bakteriální infekci žlučových cest. U kovových stentů k migraci téměř nedochází díky jejich velkému průměru a prorůstáním tkáně do jejich struktury [6, 11].

1.3.1 Mechanismus vzniku biofilmu

Usazenina v ucpaném stentu má hnědavou barvu, heterogenní vzhled a je měkká. SEM analýzou ucpaného polyethylenového stentu a biochemickou analýzou usazeniny bylo zjištěno, že tento amorfni materiál je tvořen bakteriemi a plísní, mikrobiálními odpadními produkty, proteiny, vlákninou, krystaly vápenatých solí mastných kyselin a amorfni vápenatou solí bilirubinu [12].

Běžně používané polymerní stenty jsou hydrofobní a po vložení je jejich vnitřní povrch rychle pokryt vrstvou hostitelských proteinů, jako jsou fibronectin, vitronectin, laminin, fibrin nebo kolagen. Tato proteinová vrstva podporuje mikrobiální přilnavost. Povrchové nerovnosti také podporují vznik biofilmu a bakteriální přilnavost. Mezi faktory, které ovlivňují ucpávání, řadíme imunoglobulinový-bakteriální komplex ve žluči. Imunoglobulin A i imunoglobulin G prokazatelně přitahují bakterie a ukládají je jako komplexy na vnitřní povrch polyethylenových stentů. Žlučový glykoprotein mucin, který se nachází na povrchu stentů, působí jako cement na ve vodě nerozpustné částice (bilirubin, bakteriální shluky) [12, 13].

Při pozorování usazeniny elektronovým mikroskopem bylo zjištěno, že usazenina je hlavně tvořena akumulovanými srostlými vícedruhovými mikrobiálními koloniemi, mikrobiálními odpadními produkty, solnými vápenatými krystaly bilirubinu a palmitanu. V tomto komplexu byla pozorována i velká vlákna rostlinné vlákniny, která se zde dostala ze střev. Když se žlučovodný stent vloží přes Oddiho svěrač dojde ke ztrátě antimikrobiální bariéry, tvořené svěračem. Navíc nízký tlak ve žlučovodu umožní zpětný tok obsahu střev, což podpoří mikrobiální kolonizaci [12].

Mezi bakteriemi izolovanými z usazeniny se nacházely anaerobní i aerobní bakterie, grampozitivní i gramnegativní bakterie. Při analýze přítomných bakterií v různých stádiích po implementaci stentu, bylo zjištěno, že v prvních fázích převládá role anaerobních bakterií. Mezi grampozitivními a gramnegativními bakteriemi existuje synergistický vztah, dochází k přilnutí většího množství grampozitivních bakterií, když byly přítomny i gramnegativní bakterie. To vysvětluje prodloužení životnosti stentů při užívání antibiotik působících na gramnegativní bakterie. Přehled vyskytujících se druhů mikroorganismů je v Tabulce 1 [12, 14].

Tabulka 1: Přehled druhů mikroorganismů v biofilmu [12]

Anaerobní bakterie		<i>Bacteroides</i> , <i>Clostridium bifermentans</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Fusobacterium</i> , <i>Veillonella</i>
Aerobní bakterie	Gramnegativní	<i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Hapnia alvey</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Morganella morganii</i> , <i>Proteus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Serratia</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i>
	Grampozitivní	<i>Bacillus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Staphylococcus</i>

Dalším kritickým faktorem ovlivňujícím růst biofilmu je viskozita žluči. Při zvýšení viskozity žluči se musí zvětšit průměr stentu, aby byla zachována stejná rychlost průtoku žluči. Bylo vypočítáno, že při zvětšení průměru stentu o 0,2 mm, dojde k 300% nárůstu rychlosti proudění žluči. Zúžení průměru stentu, jako důsledek nárůstu tloušťky biofilmu, způsobuje zpomalení průtoku žluči, což podporuje jak spontánní, tak bakteriemi řízenou precipitaci solí. Snížení průměru stentu o 0,2 mm odpovídá cca 200 bakteriálním vrstvám biofilmu, reálný počet vrstev je menší a závisí na množství cizích objektů v biofilmu (vláknina, solné krystaly) [12].

Prvotní přilnutí bakterií k povrchu stentu je ovlivněno mnoha faktory, jako jsou pH, teplota, obsah živin a genetické faktory (přítomnost genů kódujících pohyblivostní struktury a přilnavostní komponenty). Přítomnost hostitelských proteinů na povrchu stentu umožňuje přilnavost mikrobů, protože mohou obsahovat přilnavostní složky, které dokáží rozpoznat hostitelské proteiny na povrchu stentu. Po prvotním přilnutí a tvorbě monovrstvy, bakterie pokračují v růstu přirůstáním k první vrstvě. Během další fáze růstu prochází bakterie fenotypovými změnami vlivem působení určitých enzymů. To vede k produkci exopolysacharidového matrixu, který je označován jako sliz. Sliz umožňuje lepší přilnutí dalších mikroorganismů a ochraňuje mikroorganismy uvnitř před antimikrobiálními činiteli. Při růstu biofilmu se bakterie mohou rozšířit do nekolonizovaných míst, odpoutáním od biofilmu a vstupem do planktonického režimu. Bakterie v planktonickém režimu mohou celý cyklus opakovat na nových površích. Bakterie v planktonickém režimu jsou mnohem citlivější na antimikrobiální činitele [12].

Riziko ucpání u standardních polyethylenových stentů se progresivně zvyšuje po 3 měsících. Průměrná životnost stentů s průměrem 2,4 mm je 4 – 5 měsíců. I když stenty s větším průměrem umožňují vyšší rychlost průtoku žluči a tím oddálí riziko ucpání, dnešní duodendoskopy umožňují maximální průměr stentu 4 mm [12].

1.3.2 Metody modifikace povrchu žlučovodného stentu

Jedním z možných postupů při optimalizaci funkčnosti žlučovodných stentů je pokrytí jejich povrchu hydrofobinem, což je skupina proteinů bohatých na cystein, vylučovaných vláknitými plísněmi, jejich hlavní funkcí je snížit povrchové napětí vody, aby plíseň mohla uniknout z vodného prostředí. Hydrofobiny se samy ukládají do kontinuální monovrstvy, jak na hydrofobních, tak i hydrofilních površích, dokonce i během zkoušek in vitro. Při in vitro zkouškách, povrch pokrytý hydrofobinem vykazuje hydrofobní vlastnosti, což vede ke snížení množství materiálu, který na něj může přilnout. V kombinaci s vysoce koncentrovaným heparinem (je kyselý mukopolysacharid, široce používaný jako prostředek snižující srážlivost krve) došlo k ještě většímu snížení přilnutého materiálu. Při kombinaci s antibiotiky se žádné zlepšení neprokázalo. Před širším využitím hydrofobinu se bude muset optimalizovat jeho výrobní proces [15, 16].

V této studii byl použit komerčně dostupný plastový polyethylenový stent, který byl pokryt hydrofobinem, hydrofobinem s antibiotiky a hydrofobinem s heparinem. Stenty byly na 28 dní umístěny do tub s lidskou žlučí, které se pohybovaly tak aby simulovaly tok žluči v lidském těle. Poté se povrch stentů analyzoval pomocí SEM. Nejlepší výsledky byly pozorovány při pokrytí stentu hydrofobinem v kombinaci s vysoce koncentrovaným heparinem. Přesný mechanismus, který zapříčinil snížení přilnavosti stentu je stále neznámý. Při studiu modifikovaných stentů je jedním z problému, že mechanismus ucpávání in vitro se liší od mechanismu ucpávání při testech in vivo. Výsledky dalších výzkumů týkajících se modifikace žlučovodných stentů jsou uvedeny v tabulce 2 a 3 [15].

Tabulka 2: in vitro studie stentů [15]

Číslo, Zdroj	Návrh studie	Pokrytí	Závěr
1, Jansen B, Gastrointest Endosc 1993	Statický a perfúzní experiment s fosfátovým pufrem a žlučí	Polyurethanový stent pokrytý hydromerem	Snížená bakteriální přilnavost pouze u perfúzního experimentu
2, Cetta F, Eur J Surg 1999	Inkubace s bakteriální suspenzí získanou z ucpané žlučovodné endoprotézy	PUPA (nový biomateriál) endoprotéza pokrytá HyalSx nebo heparinem	Snížená bakteriální přilnavost
3, Seitz U, Gastroenterology 2007	Inkubace v sterilizované lidské žluči a enzymově aktivní <i>Escherichia coli</i> 35 dní	Teflonový stent pokrytý hydrofobním clearcoatem, vrstvou organických epoxidů vytvořenou pomocí sol-gel nebo vrstvou propylaminosilanů s nebo bez fluorosilanů	Při použití rozsáhlejších epoxidových ligandů došlo ke snížení přilnavosti

Tabulka 3 :in vivo studie stentů [15]

Číslo, Zdroj	Návrh studie	Pokrytí	Závěr
4, Costamagna G, Gastrointest Endosc 2000	Náhodná zkouška: plastový stent pokrytý hydromerem vs. nepokrytý stent	Polyurethanový stent pokrytý hydromerem	Žádný zásadní rozdíl
5, Van Berkel AM, Endoscopy 2003	Náhodná zkouška: plastový stent pokrytý hydrofilním polymerem vs. nepokrytý stent	Polyurethanový stent pokrytý hydrofilním polymerem	Nepokrytý stent měl delší životnost než pokrytý
6, Lee DK, Gastrointest Endosc 2005	Histologická zkouška dvou prasat 4 týdny po vložení stentu do žlučovodu	Kovový stent s vloženou paclitaxelovou membránou	Pouze minimální histologické změny v žlučovodu
7, Suk KT, Gastrointest Endosc 2007	Zkouška kovových stentů s vloženou paclitaxelovou membránou na lidech při maligní obstrukci žlučovodu	Kovový stent s vloženou paclitaxelovou membránou	Vložení stentu bylo bezpečné a bylo pozorováno pomalé uvolňování paclitaxelu

Výzkum číslo 1, se zabýval přilnavostí bakterií k hydrofilnímu polymeru a hydrofilnímu polymeru modifikovaného speciální látkou určenou k funkcionalizaci povrchu biomedicínských nástrojů - Hydromerem. Při testech přilnavosti gramnegativních a grampozitivních bakterií vykazovaly modifikované a nemodifikované stenty stejné vlastnosti, lepší vlastnosti modifikovaného stentu se projeví až při testech s fosfátovým pufrem a žlučí, kdy došlo k redukci množství přilnutých bakterií [17].

Výzkum číslo 2 testoval nový biomateriál PUPA, který je tvořený polyamidoaminem navázaným na polyurethanové řetězce. Tato struktura je schopna vázat velké množství heparinu nebo kyseliny hyaluronové v různém stádiu sulfonace (HyalSx). Test přilnavosti bakterií využil materiál získaný z ucpaného stentu. Úspěšnost modifikovaného stentu byla velice dobrá, Pouze u jednoho z pěti testovaných stentů došlo k přilnutí bakterií [18].

Výzkum číslo 3 porovnával vlastnosti různě modifikovaných teflonových stentů. Testoval vliv pokrytí stentu clearcoatem (speciální materiální úprava povrchu způsobující hydrofobicitu), vrstvou organických epoxidů připravenou metodou sol-gel a vrstvou propylaminosilanů s nebo bez fluorsilanů připravenou také metodou sol-gel. Inkubace modifikovaných materiálů probíhala po dobu 35 dní ve směsi sterilizované lidské žluči a enzymově aktivní *Escherichia coli*. Nejlepší výsledky měly materiály modifikované vrstvou vysokomolekulárních organických epoxidů [19].

Výzkum číslo 4 aplikoval výsledky výzkumu číslo 1 in vivo. Při in vitro testech došlo ke snížení přilnavosti bakterií na modifikovaný materiál, při in vivo testech kdy byly modifikované stenty umístěny do pacientů, nebyla pozorována prodloužená životnost modifikovaných stentů oproti nemodifikovaným [20].

Výzkum číslo 5 ověřoval, zda dojde k prodloužení životnosti stentu, když bude pokryt vrstvou hydrofilního polymeru. Testovala se životnost pokrytého polyurethanového stentu a standardního polyethylenového nepokrytého stentu. Ukázalo se, že pokrytý stent měl kratší životnost [21].

Výzkum číslo 6 zkoumal účinek kovového stentu s paclitaxelovou membránou. K modifikaci byl vybrán paclitaxel, protože je to jedno z léčiv, které se využívá při léčbě nádorových onemocnění. Pozorovaly se histologické změny u tkáně prasat, porovnávala se 10% a 20% koncentrace paclitaxelu. Zjistilo se, že stent modifikovaný menší koncentrací způsoboval menší histologické změny [22].

Výzkum číslo 7 navázal na výzkum číslo 6 a zkoumal účinnost kovových stentů s paclitaxelovou membránou na pacientech s obstrukcí žlučových cest způsobenou neoperovatelným zhoubným nádorem. Stent vykazoval poměrně dlouhou životnost, a navíc docházelo k pomalému uvolňování paclitaxelu, což mělo pozitivní vliv na nádorové onemocnění pacientů [23].

2. Typy antibakteriálních povrchů

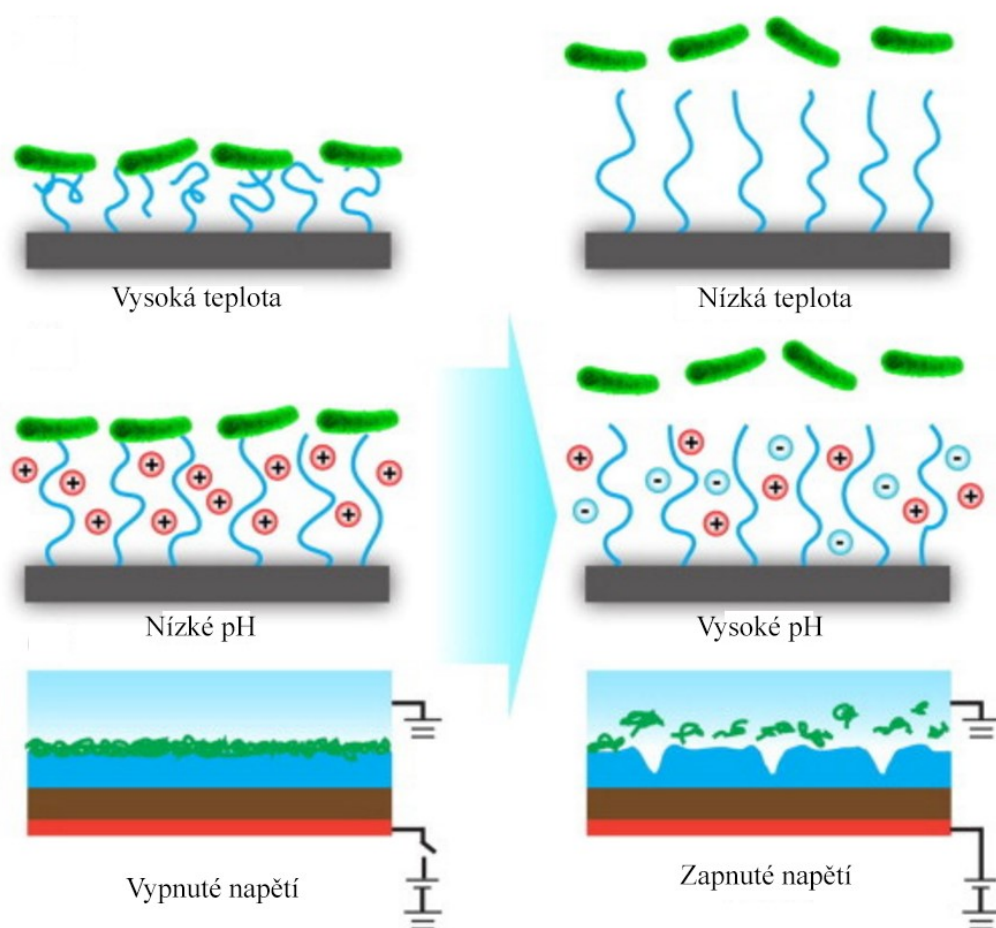
Přilnavost bakterií a následující vznik biofilmu na povrchu syntetických materiálů je velkým problémem při medicínských aplikacích těchto materiálů. V důsledku vzniku biofilmu je snížena funkčnost a životnost implantátů a hrozí riziko vzniku bakteriální infekce, to může vést až ke smrti pacienta. V posledních letech se zaměřila řada výzkumů na vývoj antibakteriálního povrchu, který by odolal bakteriím. Existují tři hlavní typy antibakteriálních povrchů. Baktericidní povrchy, které zabíjí přilnuté bakterie, povrchy odolné přilnutí bakterií a povrchy, které dokáží přilnuté bakterie uvolnit vlivem vnější síly. Každý typ povrchu má své výhody a nevýhody. Například u povrchů, které jsou schopny přilnuté bakterie zabít, dochází později ke kontaminaci povrchu odumřelými bakteriemi, což může způsobit imunitní odezvu nebo zánět. Navíc jsou tyto povrchy schopny likvidovat bakterie vzhledem k látkám, které

nepříznivě působí i na buňky lidského organismu. Zbylé dva typy jsou schopny odolat přilnutí bakterií nebo ho snížit, ale dodnes nebyl vyvinut povrch se 100% schopností odolat přilnutí bakterií, což vede k postupné kolonizaci povrchu bakteriemi, kterým se podařilo k povrchu přilnout. Pozornost je věnována přípravě ideálního povrchu, který by odolával prvotnímu přilnutí, likvidoval bakterie, které by se dokázaly na povrchu zachytit, a následně by dokázal z povrchu uvolnit jejich odumřelé schránky [24].

Baktericidní povrchy se dále dělí na dva typy podle mechanismu, jakým dochází k zabíjení bakterií. První mechanismus spočívá v kontaktu bakterie s povrchem a druhý je založen na uvolňování látky, která bakterie zabíjí. Vlastnosti kontaktních povrchů mohou být zajištěny několika způsoby. Použitím kvartérních amoniových sloučenin, polykationtů, antibiotik, ale i biologických molekul jako jsou chitosan, antimikrobiální peptidy a enzymy. V případě povrchů, které uvolňují látky, jsou jejich vlastnosti zajištěny biocidy. Biocidy jsou vloženy do povrchu a jsou pomalu uvolňovány do prostředí. Mezi nejrozšířenější biocidy patří nanočástice stříbra. Ionty stříbra narušují bakteriím membránu a ničí enzymy a nukleové kyseliny v proteinech a DNA. Dále se jako biocidy používají různá antibiotika a oxid dusnatý. Existují také povrchy, které zahrnují oba tyto mechanismy, vykazují výborné vzhledem ke kombinaci baktericidního povrchu a uvolňování biocidů. V poslední době byly vyrobeny povrchy, které mění svoji aktivitu v závislosti na externím podnětu, například při změně teploty [24, 25].

Povrchy odolné vůči přilnutí bakterií jsou založeny na faktu, že prvním stádiem vzniku biofilmu je vytvoření proteinové vrstvy, na kterém se následně zachytávají bakterie. Povrch je většinou modifikován hydrofilními polymery nebo oligomery, které vytvoří takzvanou hydratační vrstvu ve vodném prostředí, to způsobuje, že je povrch nepřilnavý. Hydratační vrstva může vznikat při použití ethylenglykolu nebo amfoterních iontů. Povrchy upravené polymery nebo oligomery založenými na ethylenglykolu, například polyethylenglykolem, vykazují dobrou odolnost vůči bakteriím. Použitím polymerů založených na amfoterních iontech vzniká biomimetický nepřilnavý povrch. Oproti ethylenglykolové hydratační vrstvě, která je udržována slabými vodíkovými vazbami, je hydratační vrstva pevně udržována elektrostatickými silami, to má za následek, že je povrch odolnější. Doposud však nebyl vytvořen 100% odolný povrch, navíc povrchy neinteragují s bakteriemi aktivně a nedochází k jejich likvidaci, tudíž dochází k postupné kontaminaci, vlivem defektů vzniklých při výrobě nebo manipulaci [24, 26].

Třetím typem povrchů jsou povrchy, u kterých dojde k prvotnímu přilnutí bakterií, ale jsou schopné je za určitých podmínek uvolnit. Vlastnosti povrchu umožní přilnutí bakterií, ale při změně teploty, pH, nebo náboje dojde také ke změně vlastností povrchu a tím k uvolnění bakterií. Nedochází pouze k uvolnění nově přilnutých bakterií, ale může dojít i k uvolnění plně vyvinutého biofilmu [24].



Obrázek 4: Materiály s proměnlivými vlastnostmi povrchu [22]

2.1 Materiály na bázi nanokompozitních polymerů

2.1.1 Transformace hydrofilního polymeru pomocí uhlíkatých nanotrubiček

Transformaci hydrofilního polymeru na hydrofobní polymer lze uskutečnit pomocí ukotvení uhlíkatých nanotrubiček na jeho povrch. Tato metoda je pouze jednokroková, vzniká při ní nanokompozitní povrch tvořený termoplastickým polyurethanem (TPU) a uhlíkatými

nanotrubíčkami (CNT). TPU byl použit jako model hydrofilního polymeru a CNT byly použity jako hydrofobní nanočástice. Mechanismus výroby spočívá pouze v lisování TPU a CNT dohromady. Část CNT je zapuštěna do TPU a část vyčnívá. Při určitém procesním čase CNT tvořily štětinovou strukturu, která byla schopna uvnitř svých pórů udržet vzduch, což vedlo k superhydrofobnímu chování. Při delších procesních časech do těchto pórů migrovaly makromolekuly TPU a to způsobilo zhoršení superhydrofobních vlastností. Z toho vyplývá, že větší význam pro hydrofobní vlastnosti má povrchová hrubost než povrchová energie [27].

2.1.2 Stříbro/titan/chitosan adipát nanokompozit

Nový nanokompozitní materiál tvořený stříbrem, titanem a adipátem chitosanu byl vytvořen fotochemickou redukcí. Adipát chitosanu sloužil jako šablona a redukční činidlo. Na jeho povrchu došlo k ukotvení kovových iontů přes Ag-N koordinační vazby a pomocí elektrostatických interakcí došlo ke stabilizaci produktu [28].

Chitosan je biodegradabilní polysacharid, vyráběný pomocí zásadité deacetylase chitinu. Je druhým nejhojněji zastoupeným přírodním biopolymerem, jeho použití nemusí být ekonomicky náročné. Je klasifikován jako netoxický, biodegradabilní, biokompatibilní a environmentálně přátelský materiál. Sám osobě je již antibakteriální a má schopnost tvořit povlak. Jeho rozpustnost je závislá na pH a může být překonána použitím chitosanových solí. Má také vysokou viskozitu, což způsobuje, že povlaky schnou pomalu. Samotné chitosanové povlaky mají pouze krátkodobou antibakteriální účinnost [28, 29].

Nanočástice stříbra mají unikátní dlouhodobé baktericidní vlastnosti. Jejich toxicita je závislá na velikosti jejich částic. Částice v rozmezí 15-30 nm jsou více toxické vůči bakteriím než ty s velikostí nad 55 nm. V této studii došlo k depozici částic v rozmezí 50-100 nm, tudíž je jejich použití pro člověka bezpečné. Existuje mnoho způsobů jak nanočástice stříbra vyrobit a stabilizovat. V tomto případě došlo k stabilizaci depozicí na chitosanovou vrstvu [28, 30].

První krokem bylo vytvoření adipátu chitosanu. Chitosan byl smíchán s kyselinou adipovou. Do vodného roztoku adipátu chitosanu byl přidán roztok AgNO_3 a roztok TiO_2 . Směs byla ošetřena ultrafialovým zářením, aby vznikl výsledný nanokompozit [28].

Analýza pomocí skenovacího elektronového mikroskopu odhalila, že částice nanokompozitu měly velikost 50-100 nm a byly deponovány na vrstvě adipátu chitosanu. Při antimikrobiálních zkouškách vykazoval nanokompozit lepší inhibiční vlastnosti než AgNO_3 a nanočástice stříbra o stejné koncentraci. [28]

2.1.3 Stříbro/polymer nanokompozity

Nanočástice stříbra jsou považovány za novou generaci antibakteriálních činidel, mají velký potenciál. Mají však své nevýhody mezi, které patří snadná agregace, nekontrolovatelné uvolňování stříbrných iontů a potenciální cytotoxicita. V poslední době se studují vlastnosti nanokompozitů tvořených polymery a nanočásticemi stříbra. Záměrem je, aby tyto kompozity měly větší biokompatibilitu a zvýšenou antibakteriální aktivitu [31].

Použití polymeru zamezuje agregaci nanočástic stříbra a umožňuje vytvoření uniformního povlaku na různých površích. Také dochází k zastavení nekontrolovatelného uvolňování stříbrných iontů a tím se omezuje cytotoxicita. Při výběru správného polymeru může mít výsledný nanokompozit povrch, který odolává adhezi bakterií a má lepší baktericidní vlastnosti. Existuje mnoho kombinací, jak lze takový nanokompozit připravit. Lze použít řadu polymerů a vytvořit různé topografie povrchu [31].

Nanočástice stříbra jsou klastry stříbrných atomů v rozmezí 1-100 nm. Mohou být syntetizovány různými metodami za použití různých prekurzorů. Výsledné nanočástice se mohou lišit svým tvarem a fyzikálně-chemickými vlastnostmi podle použité metody a prekurzoru, tudíž studium jejich baktericidních vlastností je komplexní záležitost. Existují různé mechanismy interakce nanočástic stříbra s bakteriemi [31, 32].

Jeden z mechanismů spočívá v oxidaci kovového stříbra na povrchu nanočástic a k následnému uvolnění stříbrných iontů. Stříbrné ionty interagují s buněčnou stěnou bakterií, plazmatickou membránou, bakteriální DNA, proteiny a ribozomy. Mají na všechny tyto části bakterií baktericidní efekt. Buněčná stěna bakterií je tvořena specifickou vrstvou peptidoglykanu, který se skládá ze sacharidů a aminokyselin. Dochází k vazbě stříbrných iontů na negativně nabitou peptidoglykanovou vrstvu, ve které se nachází mnoho enzymů a receptorů zodpovědných za dýchání. Tím dojde k zabránění vstupu kyslíku a bakterie zaniká. Grampozitivní bakterie jsou více odolné díky tomu, že mají mnohem silnější

peptidoglykanovou vrstvu než gramnegativní bakterie. Díky tomu stříbrné ionty reagují pouze se svrchní vrstvou peptidoglykanové vrstvy a nemají dostatečný vliv na přístup kyslíku. Stříbrné ionty, které difundují do buňky bakterií, se váží na negativně nabitou plazmatickou DNA, tím dojde k zastavení replikace a transkripce, to má za následek zamezení reprodukce. Při provedení antibakteriálních testů za anaerobních podmínek stříbrné nanočástice nevykazovaly žádný baktericidní efekt [31, 33].

Druhý mechanismus nespočívá v uvolňování stříbrných iontů, ale je založený na vlastních antibakteriálních vlastnostech nanočástic stříbra. Nanočástice stříbra se dokáží navázat na buněčnou stěnu a proniknout přes ni, dojde ke změně struktury, degradaci a nakonec k buněčné smrti. Třetí mechanismus je založen na generaci reaktivních molekul obsahujících kyslík. Tato vlastnost je způsobena různými materiály. Vlivem reaktivních molekul obsahujících kyslík dochází k narušení oxidační/anti-oxidační rovnováhy v buňkách bakterií. Narušením rovnováhy vzniká oxidativní stres, jehož vlivem jsou poškozeny proteiny, membrány a DNA. Morfologie nanočástic stříbra má také vliv na jeho baktericidní vlastnosti. Čím menší nanočástice stříbra jsou, tím je větší poměr povrchu k objemu a uvolňování stříbrných iontů je daleko snadnější. Menší nanočástice také pronikají do bakterií snadněji a generují více reaktivních molekul obsahujících kyslík. Výborné baktericidní vlastnosti malých nanočástic stříbra ovšem limitují jejich použití v různých povlacích pro medicínské účely, protože kromě vlivu na bakterie mají negativní vliv i na lidské buňky. Cytotoxicita byla potvrzena při in vitro i při in vivo testech. Mechanismy cytotoxicity jsou podobné mechanismům interakce s bakteriemi. Úroveň cytotoxicity je vyšší než úroveň antibakteriálního účinku. Dlouhodobá expozice krys malým koncentracím nanočástic stříbra vyvolává toxické účinky. Jelikož se biokompatibilní polymery využívají k redukci toxických efektů nanomateriálů, mohou být také využity k produkci antibakteriálního povlaku obsahujícího nanočástice stříbra [31, 34].

Polymerní materiály jsou flexibilní, existuje mnoho způsobu depozice částic a ovlivnění jejich struktury. Jako součást antibakteriálních povlaků mají různé chemické a fyzikální funkce. Hlavní funkcí je stabilizace při syntéze nanočástic stříbra a prevence agregace v roztocích nebo na površích. Další funkcí je, že polymer působí jako pojivo pro nanočástice stříbra, které jsou uloženy přímo nebo in-situ syntetizovány v antibakteriálních kompozitních povlacích. Polymer může být také použit jako matrice pro nanočástice stříbra, a tím kontrolovat uvolňování stříbrných iontů. Tyto funkce jsou ovlivněny způsobem přípravy kompozitních povlaků [31].

Kombinací baktericidního polymeru s nanočásticemi stříbra je dosaženo zvýšení efektivity antibakteriálního účinku a prodloužení životnosti. V první fázi jsou za antibakteriální účinek zodpovědné nanočástice stříbra, po jejich vyčerpání skrz uvolňování stříbrných iontů jsou antibakteriální vlastnosti zajištěny polymerem. Polymery obsahující kvartérní amoniové sloučeniny jsou nejrozšířenějším typem baktericidního polymeru. Skládají se ze tří částí, z apolárního alkylového řetězce, mezerníků (spacers) a kationtových skupin. Spacers zajišťují mobilitu kationtových skupin, tak aby mohly mít antibakteriální efekt. Materiál, který kombinuje kvartérní amoniové sloučeniny s hydrofobním alkylovým řetězcem má velice dobré antibakteriální vlastnosti. Alkylový řetězec pozitivně ovlivňuje antibakteriální vlastnosti vlivem své lipofilicity [31, 35].

Konkrétními příklady takovýchto kompozitů je PET modifikovaný QAC a nanočásticemi stříbra, chitosan/heparin/nanočástice stříbra. Existuje mnoho dalších baktericidních polymerů, se kterými mohou být nanočástice stříbra zkombinovány, což má velký potenciál pro budoucí výzkumy. Další možností je kombinace nanočástic stříbra s polymery, které jsou odolné vůči adhezi bakterií. Odolností vůči adhezi ovlivňují již první kritický krok formace biofilmu. Nejčastěji využívaným polymerem je polyethylenglykol (PEG). Takovéto kompozity snižují adhezi proteinů a bakterií a vykazují silně bakterie odpuzující efekt a také silné baktericidní vlastnosti. Omezení adheze záleží na délce řetězce polymeru, molekulární hmotnosti PEG a hustotě roubování polymeru. Kromě PEG je možné použít jiné přírodní polymery jako dextran nebo heparin. Kromě snížení adheze bakterií mají kompozity obsahující tyto polymery lepší biokompatibilitu [31].

Existuje mnoho způsobů integrace nanočástic stříbra do kompozitů. Dva hlavní mechanismy jsou přímá adsorpce nanočástic stříbra nebo in-situ syntéza. Přímá adsorpce je snadná a kontrolovatelná metoda, ale může vyvolat agregaci nanočástic. In-situ syntéza je komplikovanější metoda, lze s ní však docílit uniformní distribuce nanočástic stříbra v polymerní matici [31].

Praktická část

3. Použité materiály, přístroje a postupy

3.1 Použité materiály

V praktické části bakalářské práce byly použity tyto materiály:

- Polyethylenoxid – 400000 g/mol (Sigma-Aldrich)
- Vinyl-acetát – 99,7% (Sigma-Aldrich)
- Vícevrstevné uhlíkaté nanotrubičky – NC7K (Nanocyl)
- Kyselina sírová – 96% (Mach chemikálie s.r.o.)
- Manganistan draselný (Mach chemikálie s.r.o.)
- Dibenzoylperoxid (Sigma-Aldrich)
- Dichlormethan (Sigma-Aldrich)
- Vermikulit Palabora (Grena, a.s.)
- Hexadecyltrimethylamoniumbromid – 98% (Sigma-Aldrich)
- Hexadecylpyridiniumchlorid – 97% (Sigma-Aldrich)
- Demineralizovaná voda (Merck milipore)
- Hydroxid sodný – 98% (Lach:ner)
- Chlorid sodný (Lach:ner)

3.2 Použité přístroje

V praktické části bakalářské práce byly použity přístroje:

- DEN-1 McFarland Densitometer BioSan
- Biological thermostat BT 120M
- Ultrazvuk – Ultrasonic cleaner VWR
- Světelný digitální mikroskop VHX-500 Keyence Corporation,
- Magnetické míchadlo s ohřevem – WiseStir MSH-20D
- Analytické váhy – Tecator 6110 Balance
- Analyzátor fázového uhlíku - LECO RC612
- skenovací elektronový mikroskop Quanta 450 FEG FEI
- FTIR spektrometr Nicolet 6700 FT-IR - Thermo Scientific, USA

3.3 Metody charakterizace připravených materiálů

3.3.1 Analýza uhlíku

K analýze čistoty uhlíkatých nanotrubiček, míry jejich modifikace a míry modifikace jílu, byl použit analyzátor fázového uhlíku LECO RC612. V přístroji dochází ke spalování vzorku, podle výsledných dat je následně vyhodnocen celkový obsah uhlíku.

3.3.2 FTIR

Měření FTIR spekter vzorků probíhalo metodou ATR, při měření byl použit diamantový ATR nástavec. Obsluha přístroje je plně automatická a probíhá přes počítačový software OMNIC. Spektra byla měřena v rozsahu $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$. Spektra byla upravena pomocí ATR korekce, automaticky bylo srovnáno pozadí.

3.3.3 Světelný digitální mikroskop

K měření vzorků byl použit světelný digitální mikroskop VHX-500. Připravené polymerní materiály byly použity při měření bez jakýchkoli dalších úprav. Všechny použité snímky z optického mikroskopu byly pořízeny při 400x zvětšení.

3.3.4 SEM

K měření vzorků byl použit skenovací elektronový mikroskop Quanta 450 FEG. Připravené polymerní materiály byly naneseny na mikroskopické sklíčko, které bylo následně naprášeno 30nm vrstvou chromu, která způsobila elektrickou vodivost a umožnila vzorky pozorovat.

3.3.5 Antimikrobiální testy

Pro hodnocení antibakteriální aktivity byly využity tyto kmeny z České sbírky mikroorganismů: *Staphylococcus aureus* 3953, *Escherichia coli* 3954, *Enterococcus faecalis* 4224, *Pseudomonas aeruginosa* 1960. Koncentrace inokula byla určena pomocí DEN-1 Densitometer na 0,5 McFarland, což odpovídá $1,5 \cdot 10^8$ CFU/ml. Inkubace probíhala v termostatu Biological thermostat BT 120M při 37°C po dobu 24h. Testy byly prováděny na agaru Mueller-Hinton. Jeho teoretické složení uvedeno níže je v gramech na litr destilované vody:

- masová infúze - 4,0
- kaseinový hydrolyzát - 17,5
- kukuřičný škrob - 1,5
- agar: 12,0

Výsledné pH použitého agaru bylo $7,3 \pm 0,1$. Agarové plotny byly inokulovány příslušnými kmeny. Na inokulované plotny byly umístěny čtverečky vzorků polymerní vrstvy velikosti 1x1cm a následně inkubovány. Po 24h bylo provedeno vizuální vyhodnocení. Hodnocení antibakteriální aktivity bylo prováděno v Laboratoři klinické mikrobiologie AGEL, Ostrava-Vítkovice.

4. Připravené materiály

4.1 Modifikace jílu

Prvním krokem bylo smíchání vermikulitu s roztokem chloridu sodného ($c = 1 \text{ mol/l}$). Směs byla zahřívána na 70 °C a míchána po dobu dvou hodin. Poté byl roztok zfiltrován a promyt demineralizovanou vodou. Celý postup se ještě jednou opakoval a po zfiltrování byl promýván do vymizení chloridových iontů. Tímto postupem došlo ke konverzi vermikulitu na Na-vermikulit. Vysušený a pomletý Na-vermikulit byl přidán do roztoků HDP a HDTMA, roztoky byly připraveny tak, aby došlo k 50% využití kationtové výměnné kapacity. Následovala filtrace a promytí demineralizovanou vodou, tento cyklus se opět opakoval a nakonec došlo k promytí do vymizení bromidových iontů. Modifikované vermikulity byly po vysušení a pomletí připraveny k použití.

4.2 Uhlíkaté nanotrubičky

4.2.1 Čištění uhlíkatých nanotrubiček

Před použitím uhlíkatých nanotrubiček při přípravě polymerních vrstev proběhlo jejich čištění pro odstranění přítomných nečistot. Jeden gram trubiček byl rozmíchán v 50 ml destilované vody, poté bylo přidáno 30 ml 96% kyseliny sírové a 0,3 gramu manganistanu draselného. Vlivem přidání kyseliny došlo k prohrátí celé směsi. Směs byla hodinu míchána na magnetické míchače a následně byla zfiltrovaná. Trubičky byly na filtru promývány demineralizovanou vodou, do neutrálního pH. Vyčištěné uhlíkaté nanotrubičky byly nakonec vysušeny.

4.2.2 Modifikace uhlíkatých nanotrubiček

Vyčištěné uhlíkaté nanotrubičky byly dále modifikovány pomocí HDTMA. Modifikace probíhala tak, že HDTMA byl rozpuštěn v destilované vodě a do tohoto roztoku byly přidány uhlíkaté nanotrubičky. Celá směs byla ošetřena ultrazvukem, aby došlo k dobré disperzi nanotrubiček. Roztoky byly připravovány podle množství, které měl obsahovat výsledný materiál. Poměr jednotlivých složek voda : HDTMA : uhlíkaté nanotrubičky byl 1000 : 5 : 0,5. Pro přípravu polymerních vrstev z polyvinylacetátu bylo připraveno větší množství směsi, ze které byla odpařena voda, a při přípravě byly použité suché modifikované trubičky. Průběh polymerizace polyvinylacetátu by byl narušen přítomností vody [36].

4.3 Polymerní vrstvy

4.3.1 Příprava polyethylenoxidových vrstev

Příprava vzorků byla stejná, lišila se pouze množstvím modifikujících látek. Prvním krokem přípravy vzorku číslo jedna bylo rozpuštění polyethylenoxidu ve vhodném rozpouštědle. Jako rozpouštědlo byl použit dichlormethan, vzhledem k jeho dobré schopnosti se rychle odpařovat. K 100 mg polyethylenoxidu byly přidány 3 ml dichlormethanu. Aby došlo k dokonalému rozpuštění, byla směs mírně zahřívána v ultrazvukové lázni. K 10 mg vermikulitu modifikovaného HDTMA byly přidány 2 ml dichlormethanu a směs byla rozmíchána v ultrazvukové lázni. Po rozpuštění polyethylenoxidu byl přidán roztok

modifikovaného jílu. Výsledný roztok byl před poslední fází přípravy vrstvy ošetřen ultrazvukem, aby bylo dosaženo dobré disperze modifikující látky.

Vrstvy byly připravovány dvěma způsoby. Jeden spočíval v odpaření rozpouštědla na Petriho misce, ze které byla následně vrstva vyjmuta. Druhý spočíval v lití roztoku na teflonovou fólii přilepenou k rotujícímu disku. Rotaci došlo k vytvoření tenké homogenní vrstvy, která šla snadno oddělit od podkladové fólie. Vlastnosti fólií byly přímo ovlivněny různou koncentrací modifikujících složek. Se zvyšující se koncentrací se snižovala pružnost fólie a při manipulaci docházelo k mechanické deformaci. Zvýšená koncentrace uhlíkatých nanotrubiček se projevila zvýšenou mírou shlukování trubiček, ve výsledném materiálu bylo možné zřetelně pozorovat ohraničené oblasti se zvýšenou koncentrací trubiček. To vedlo k značnému zhoršení mechanických vlastností vytvořených fólií. Celkem bylo připraveno jedenáct vzorků s polyethylenoxidem, jejichž přehled je uveden v tabulce 4.

Tabulka 4: Přehled připravených vzorků

Číslo vzorku	Polymer	Modifikující látka	Koncentrace [hmotnostní %]
1	Polyethylenoxid	Vermikulit – HDTMA	10 %
2	Polyethylenoxid	Vermikulit – HDTMA	50 %
3	Polyethylenoxid	Vermikulit – HDTMA	100 %
4	Polyethylenoxid	Vermikulit – HDP	10 %
5	Polyethylenoxid	Vermikulit – HDP	50 %
6	Polyethylenoxid	Vermikulit – HDP	100 %
7	Polyethylenoxid	Uhlíkaté nanotrubičky	0,1 %
8	Polyethylenoxid	Uhlíkaté nanotrubičky	0,5 %
9	Polyethylenoxid	Uhlíkaté nanotrubičky	1 %
10	Polyethylenoxid	Uhlíkaté nanotrubičky	2 %
11	Polyethylenoxid	Uhlíkaté nanotrubičky	5 %
12	Polyvinylacetát	Vermikulit – HDTMA	1 %
13	Polyvinylacetát	Vermikulit – HDTMA	5 %
14	Polyvinylacetát	Vermikulit – HDP	1 %
15	Polyvinylacetát	Vermikulit – HDP	5 %
16	Polyvinylacetát	Uhlíkaté nanotrubičky	0,1 %
17	Polyvinylacetát	Uhlíkaté nanotrubičky	0,5 %

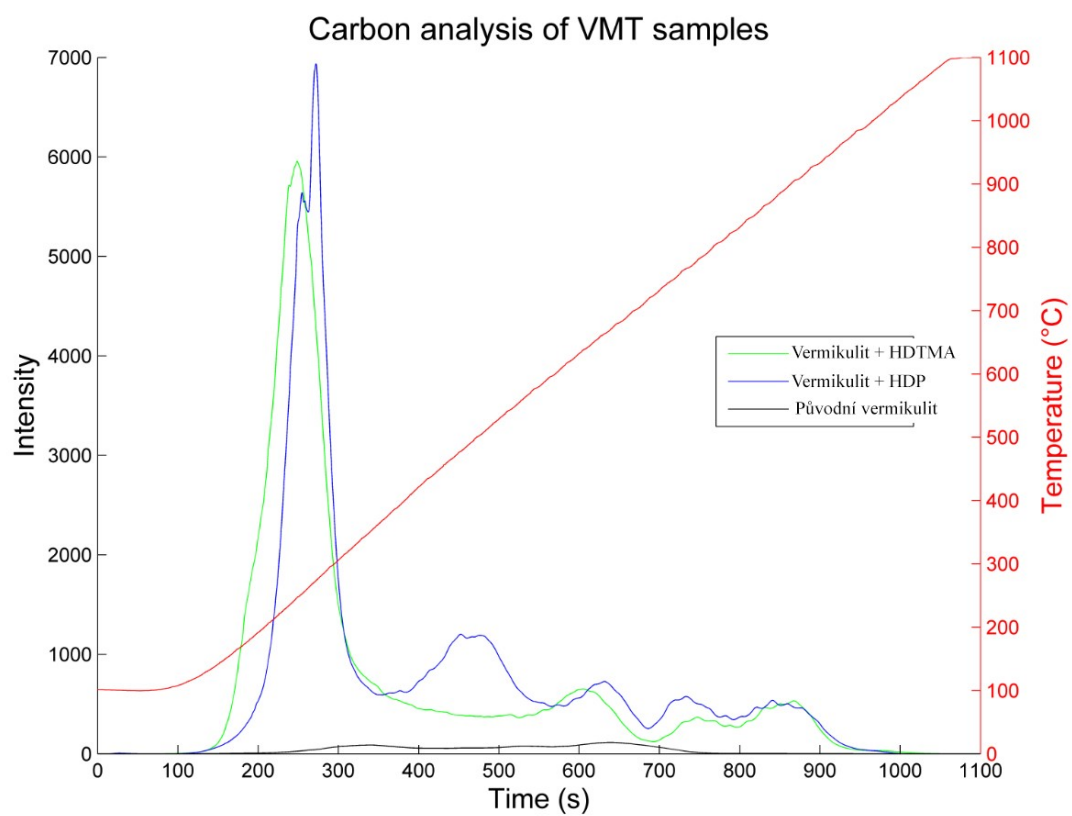
4.3.2 Příprava polyvinylacetátových vrstev

Jednotlivé vzorky, které byly připraveny z polyvinylacetátu, se připravovaly stejně až na množství navážky modifikující látky. Při přípravě vzorku číslo 12 bylo do 10 g monomeru vinyl-acetátu přidáno 0,1 g vermikulitu modifikovaného HDTMA a katalyzátor benzoyl peroxid. Směs byla ošetřena ultrazvukem pro lepší disperzi. Polymerizace byla inicializována zahříváním směsi na 130 °C po dobu 1-2 hodin.

Po dostatečném zahřátí se zvýšila viskozita směsi. Následovalo vylití na teflonovou fólii přilepenou k rotujícímu disku. Po zaschnutí byly připravené vrstvy z fólie odděleny. Ze vzorků uvedených v tabulce 4 se podařilo připravit pouze vzorky číslo 12, 14 a 15. Při vyšší koncentraci vermikulitu modifikovaného HDTMA (vzorek 13) i při použití uhlíkatých nanotrubiček (vzorek 16 a 17) nedošlo k zahájení polymerizace ani po dvou hodinách zahřívání, směs nejevila žádné známky změny, vypadala stejně jako na počátku.

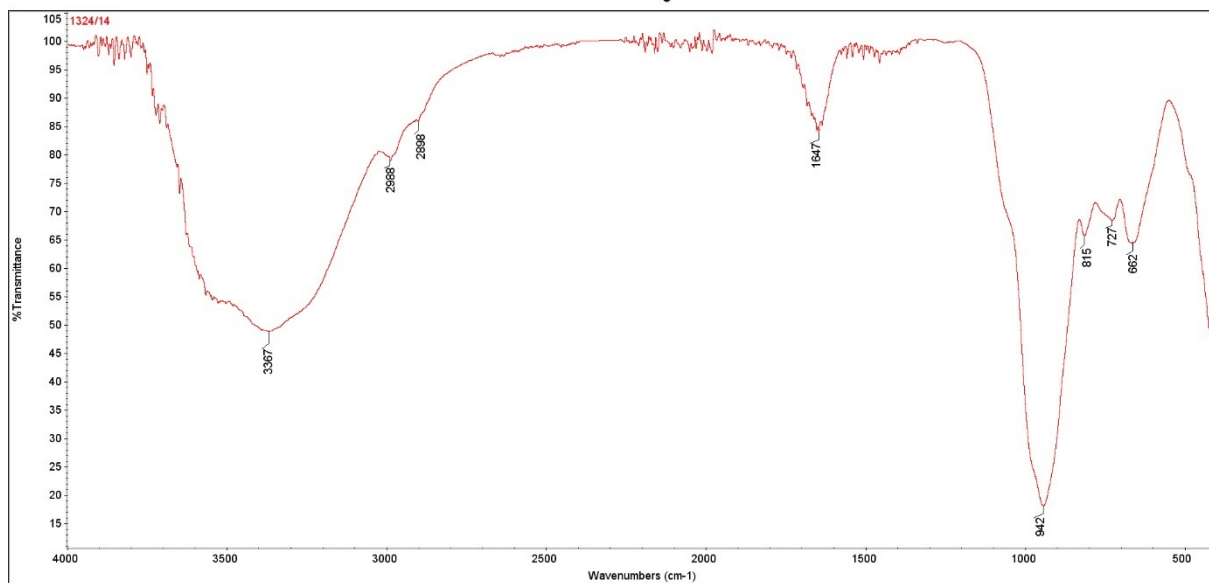
5. Výsledky a diskuze

K analýze modifikovaných vzorků vermikulitu byl použit analyzátor fázového uhlíku a FTIR. Analýzou původního vermikulitu a modifikovaných vermikulitů v analyzátoru fázového uhlíku se zjistilo, že došlo k úspěšné modifikaci vermikulitu HDP i HDTMA, což lze vidět na obrázku 5, kde výrazné píky odpovídají organickému uhlíku v řetězcích HDP a HDTMA, zatímco nemodifikovaný vermikulit organický uhlík neobsahoval. FTIR spektra jsou na obrázku 6. Při analýze FTIR spekter vidíme, že na záznamu nemodifikovaného vermikulitu se vyskytují charakteristické absorpční pásy pro vermikulit v oblasti $1000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$, přítomnost organických látek je sice znatelná v oblasti $3000\text{--}2850\text{ cm}^{-1}$, ale jde zřejmě o znečištění původního vermikulitu. Na záznamech modifikovaných vermikulitů se kromě charakteristických absorpčních pásů pro vermikulit vyskytují i absorpční pásy charakteristické pro vazby C-H, C-C a C=C, a tím i pro modifikující látky HDP a HDTMA ($3000\text{--}2850\text{ cm}^{-1}$, $1650\text{--}1630\text{ cm}^{-1}$, $1500\text{--}1450\text{ cm}^{-1}$).

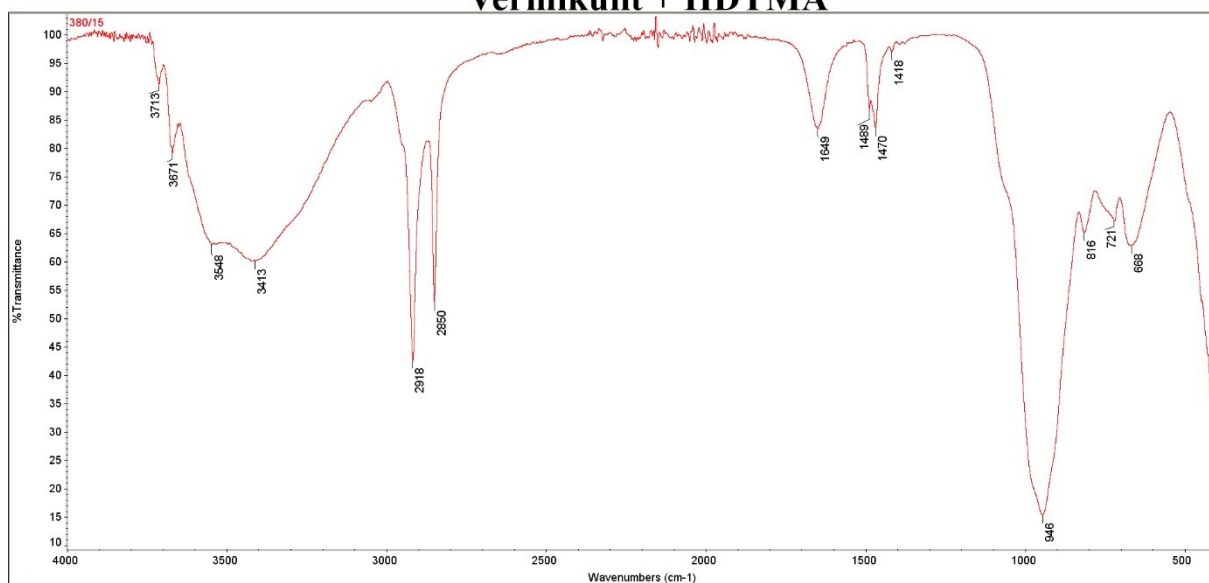


Obrázek 5: Záznam analýzy vermikulitů

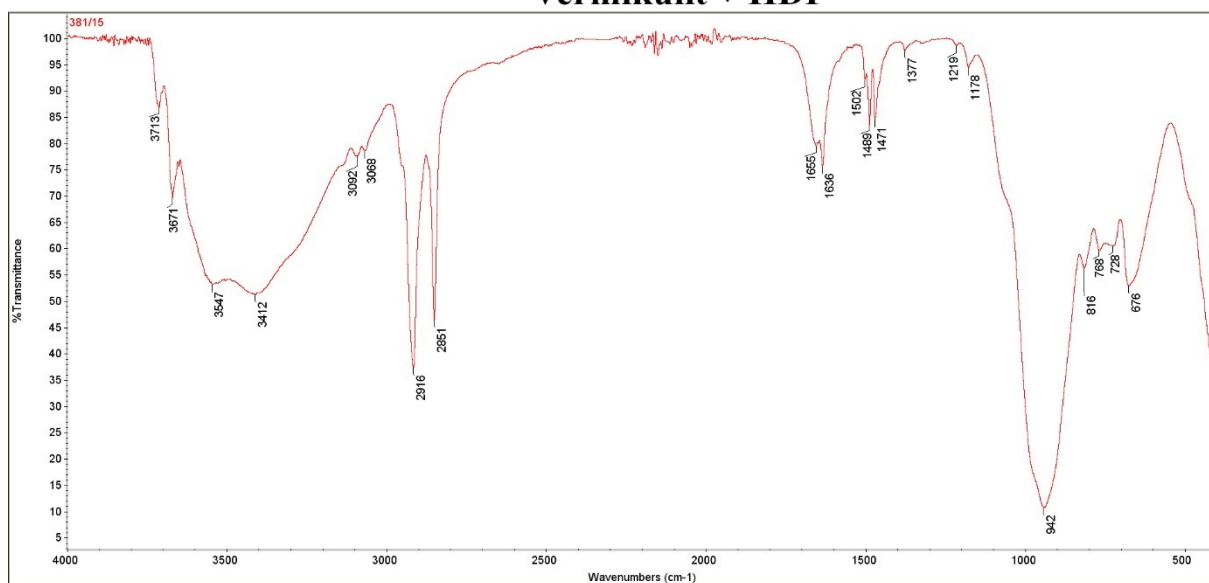
Nemodifikovaný vermikulit



Vermikulit + HDTMA

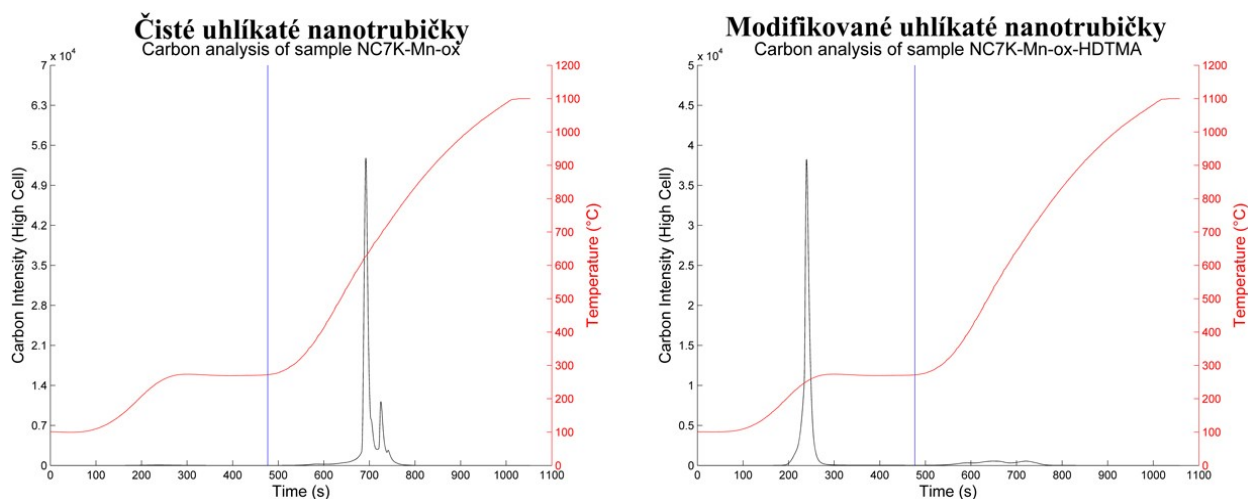


Vermikulit + HDP



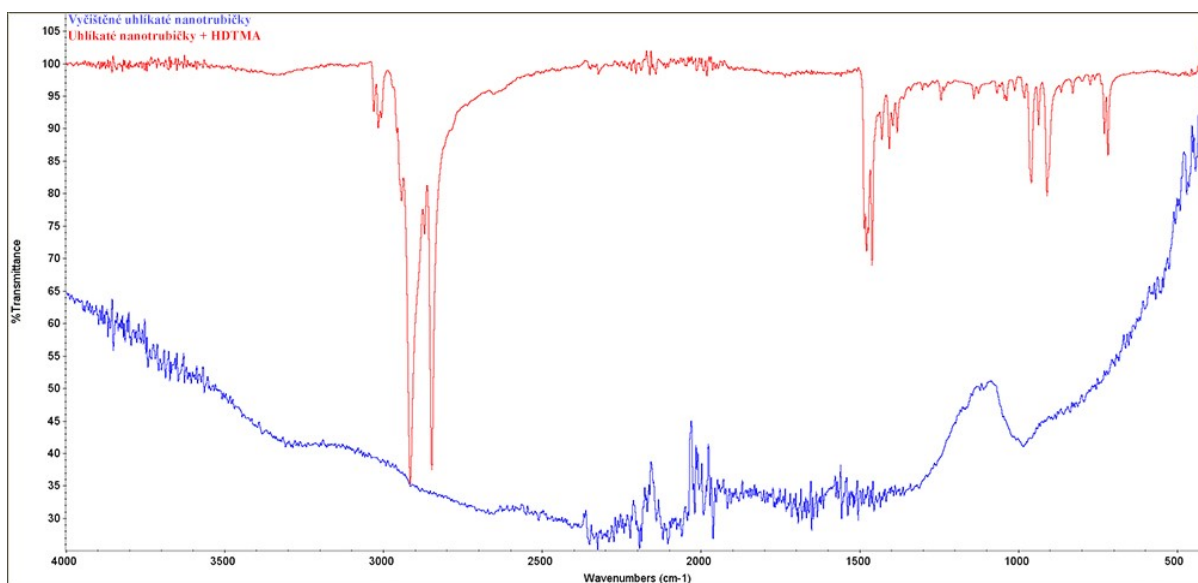
Obrázek 6: FTIR spektra vermikulitů

K analýze vyčištěných a modifikovaných uhlíkatých nanotrubiček byl použit analyzátor fázového uhlíku a FTIR. Analýzou vyčištěných uhlíkatých nanotrubiček v analyzátoru fázového uhlíku se zjistilo, že obsahovaly 85,2 % uhlíku, 8,8 % zbytku katalyzátoru a zbylých 6 % tvořilo malé množství vodíku, síry a kyslíku. U uhlíkatých nanotrubiček modifikovaných HDTMA se zjistilo, že obsahovaly 68,3 % HDTMA a 8,4 % uhlíkatých nanotrubiček. Záznamy jsou na obrázku 7 [37].



Obrázek 7: Záznam analýzy modifikovaných uhlíkatých nanotrubiček

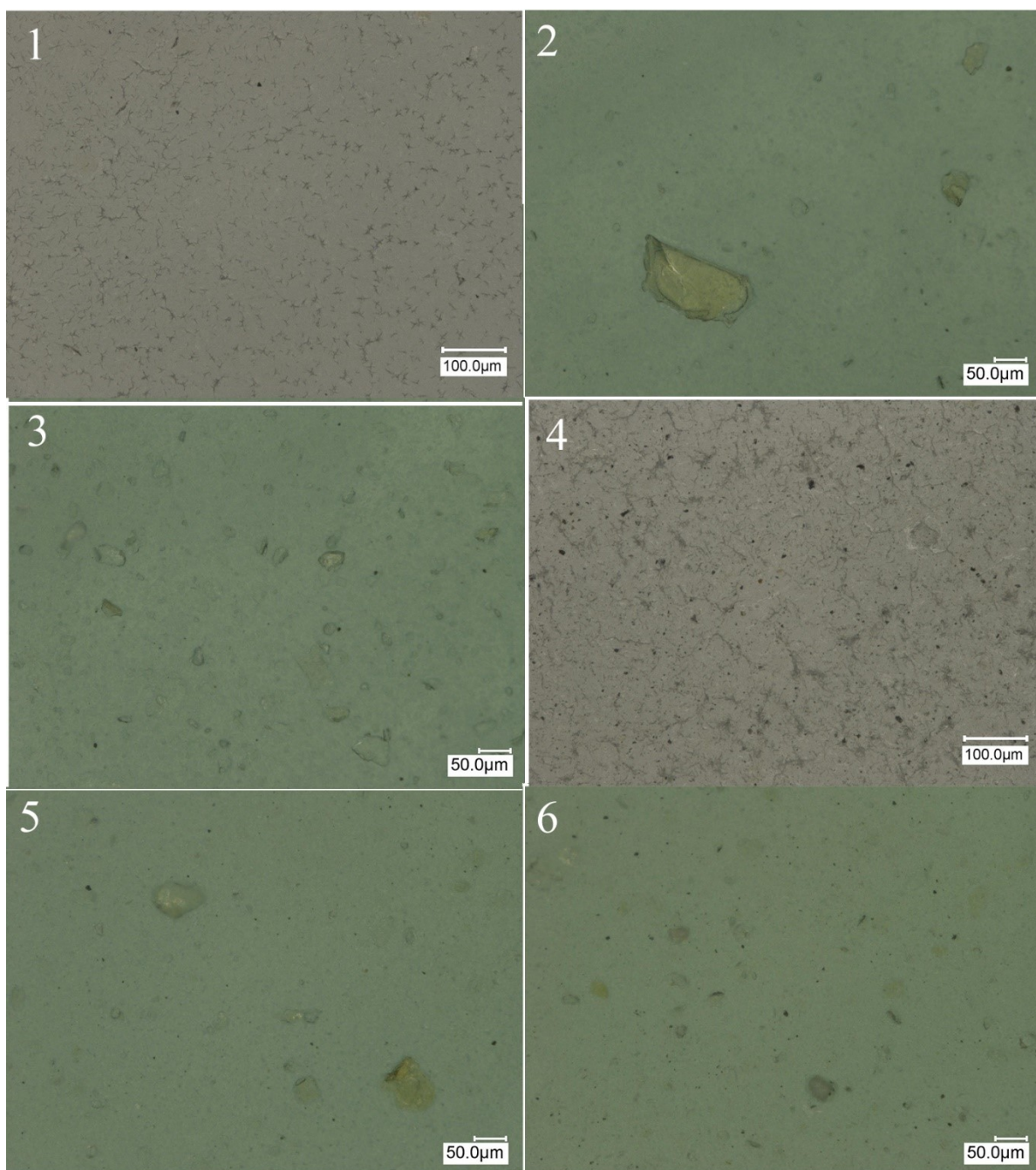
Na FTIR spektrech na obrázku 8 můžeme pozorovat značnou odlišnost nemodifikovaných a modifikovaných uhlíkatých nanotrubiček. U FTIR spektra modifikovaného vzorku zřetelně vidíme charakteristické absorpční pásy pro HDTMA ($3000-2850\text{ cm}^{-1}$), které v případě nemodifikovaných trubiček vůbec nejsou identifikovány [37].



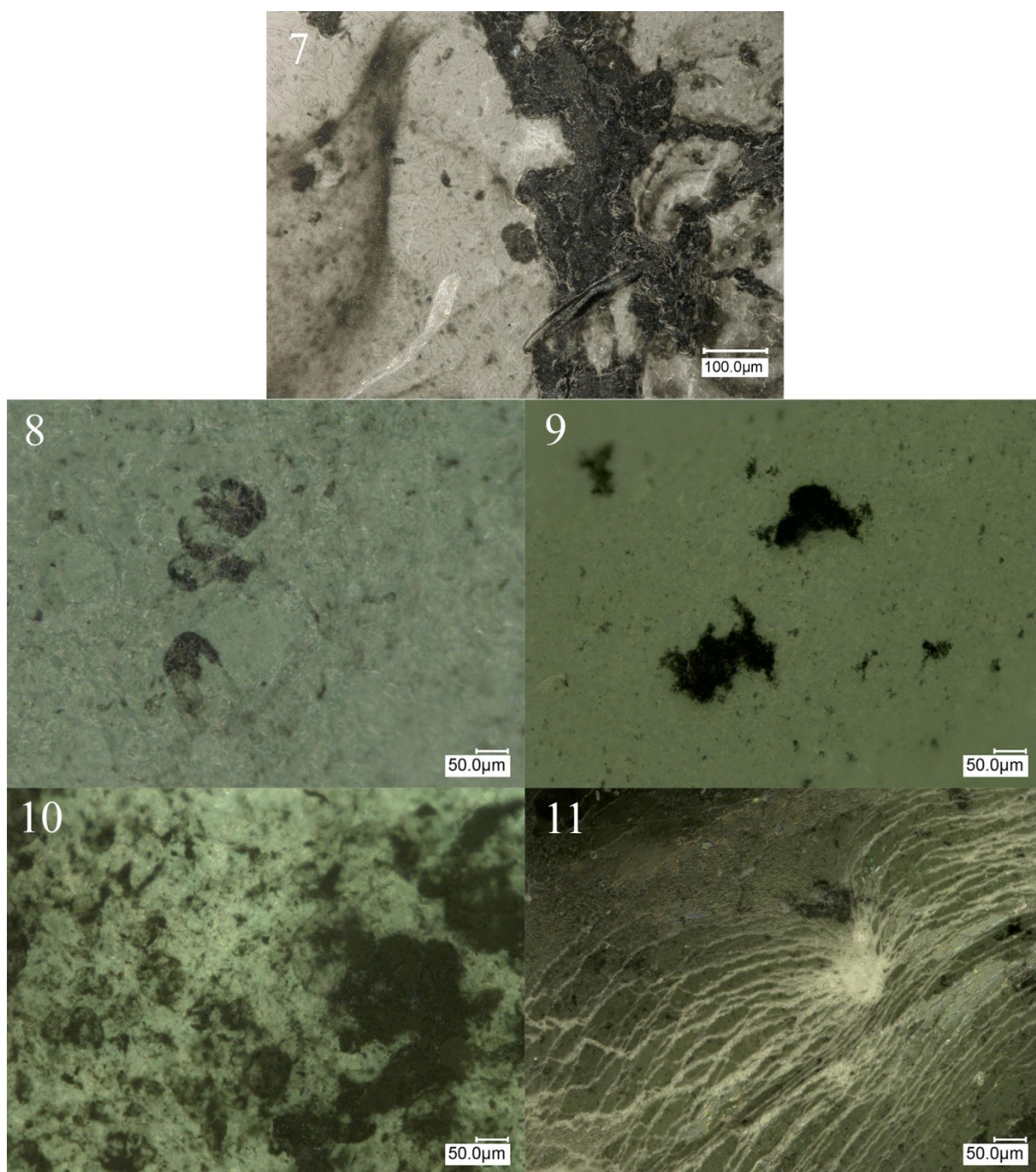
Obrázek 8: FTIR spektra uhlíkatých nanotrubiček

Vzhledem k cíli této práce byla testována i rozpustnost připravených polymerních vrstev. U všech vrstev připravených z polyethylenoxidu došlo k degradaci po ponoření jak do demineralizované vody, tak i po ponoření do vodného roztoku hydroxidu sodného o pH 8. Uvedené pH bylo zvoleno tak, aby odpovídalo prostředí pH ve žlučovodu. U vrstev připravených z polyvinylacetátu nebyly pozorovány žádné vizuální změny mechanických vlastností, vrstvy měly stejné vlastnosti i po vytažení.

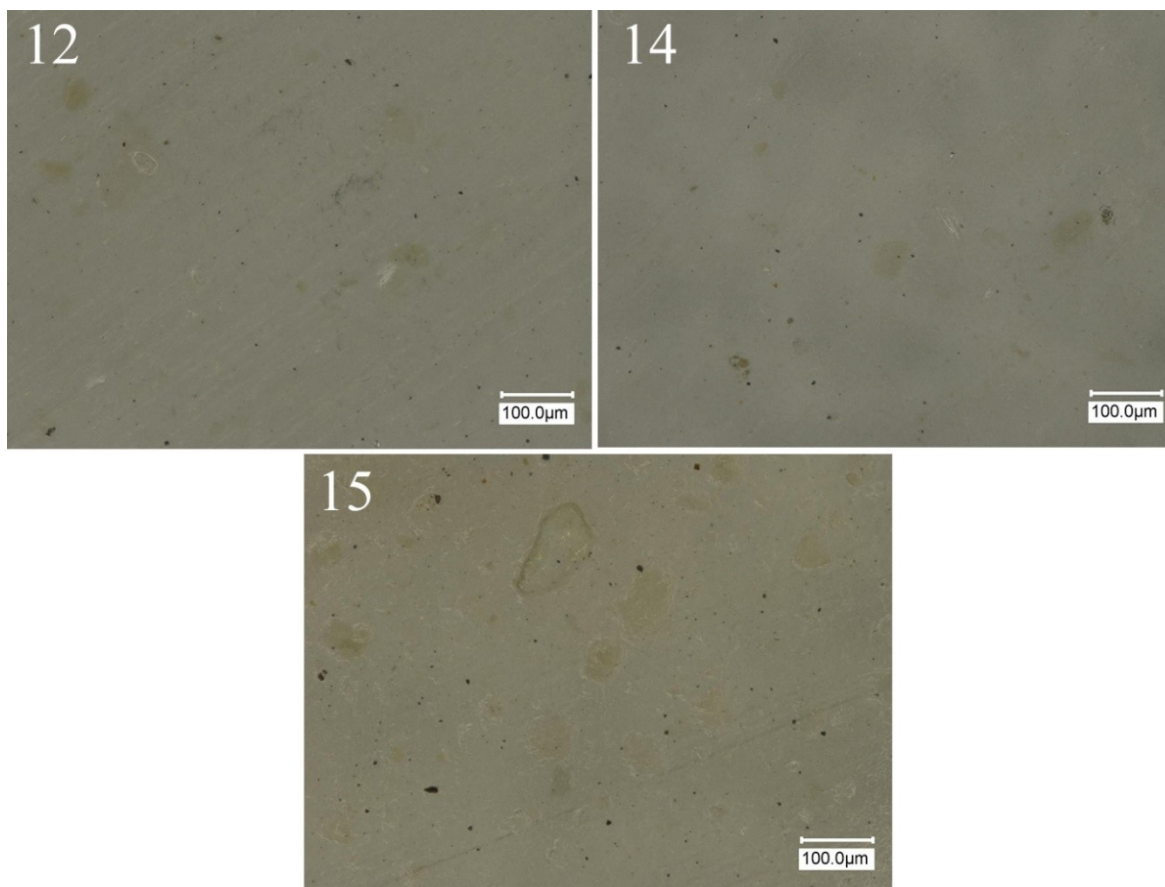
Snímky vzorků polymerních vrstev ze světelného digitálního mikroskopu jsou na obrázcích 9 až 11. Na obrázku 9 jsou snímky polymerních vrstev z polyethylenoxidu s obsahem modifikovaného vermikulitu. Mezi jednotlivými vzorky 2, 3, 5 a 6 není na první pohled viditelný rozdíl. Lze pozorovat dobrou disperzi částic vermikulitu s různou distribucí velikostí částic a u vzorků 3 a 6 větší koncentraci částic. Vzorky 1 a 4 (foceny na jiném podkladu) mají odlišnou strukturu, což může být způsobeno menší koncentrací modifikující látky. Na obrázku 10 jsou vzorky polymerní vrstvy z polyethylenoxidu obsahující modifikované uhlíkaté nanotrubičky. Lze zde vidět změnu struktury vzorků v závislosti na zvyšující se koncentraci modifikovaných nanotrubiček. Již při nejnižších koncentracích bylo možné pozorovat shluky uhlíkatých nanočástic. U vzorku 11 lze pozorovat mechanickou deformaci vzorku, kvůli špatným mechanickým vlastnostem způsobených zvýšenou koncentrací uhlíkatých nanotrubiček. Na obrázku 11 jsou vzorky polymerní vrstvy z polyvinylacetátu obsahující různé koncentrace modifikovaného vermikulitu. Na první pohled mezi nimi není žádný viditelný rozdíl, akorát větší koncentrace částic u vzorku 15, který obsahoval 5 % vermikulitu modifikovaného HDP.



Obrázek 9: Snímky z mikroskopu vzorků 1, 2, 3, 4, 5 a 6

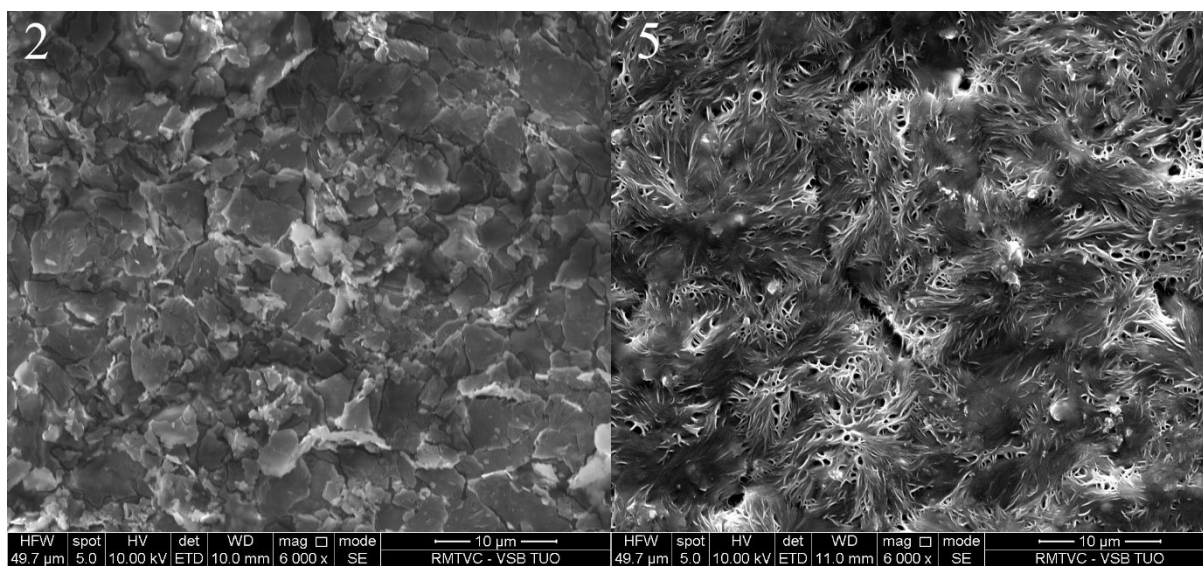


Obrázek 10: Snímky z mikroskopu vzorků 8, 9, 10 a 11



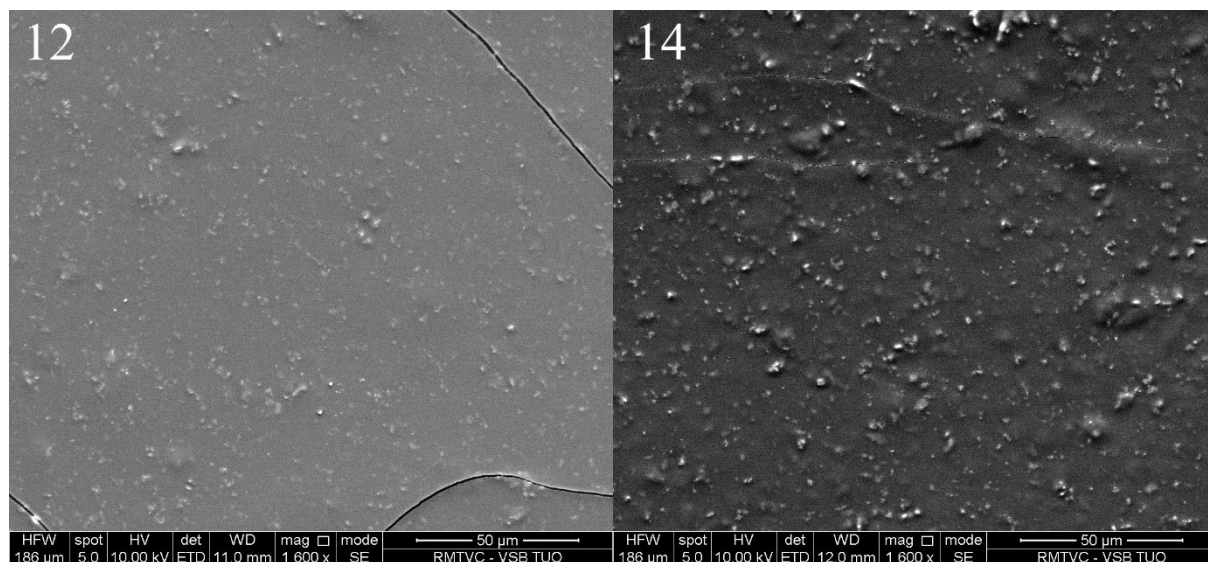
Obrázek 11: Snímky z mikroskopu vzorků 12, 14 a 15

Na obrázku 12 jsou snímky polyethylenoxidové vrstvy pořízené pomocí skenovacího elektronového mikroskopu. Je viditelný vliv modifikující látky na výslednou strukturu polymeru. Oba vzorky mají velice členitý povrch, jejich struktura je však odlišná. U vzorku 2 je zřetelný destičkovitý charakter povrchu a u vzorku 5 se vyskytuje rozvětvená struktura.



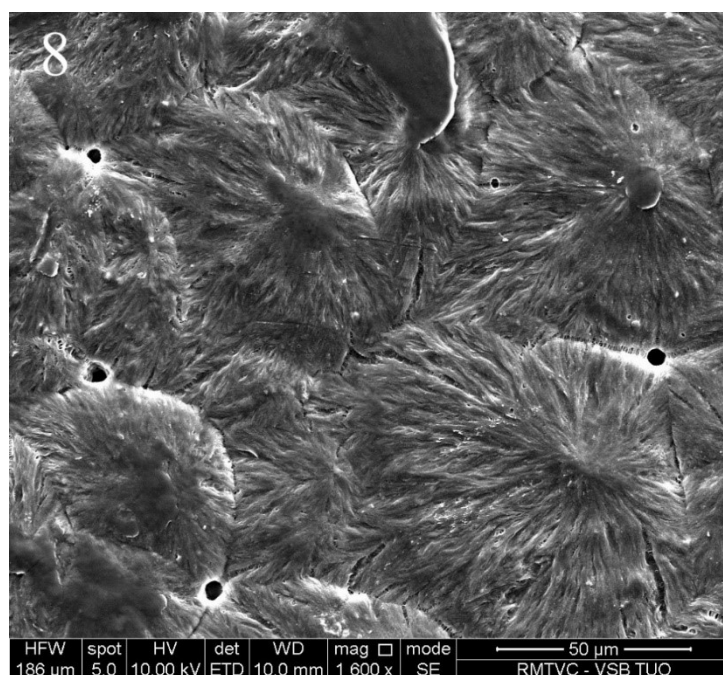
Obrázek 12: SEM snímky vzorku 2 a 5

Z porovnání vlivu modifikující látky na strukturu výsledné polymerní vrstvy vyplývá, že u polyvinylacetátu mají oba vzorky podobnou strukturu povrchu. Při modifikaci vermikulitem s obsahem HDTMA je povrch je hladší. Částice z něj nevystupují tak jako u vzorku 14, který obsahuje vermikulit modifikovaný HDP. Oproti polyethylenoxidovým vrstvám jsou mnohem méně členité, což to je způsobeno rozdílnou koncentrací modifikujících složek.



Obrázek 13: SEM snímky vzorku 12 a 14

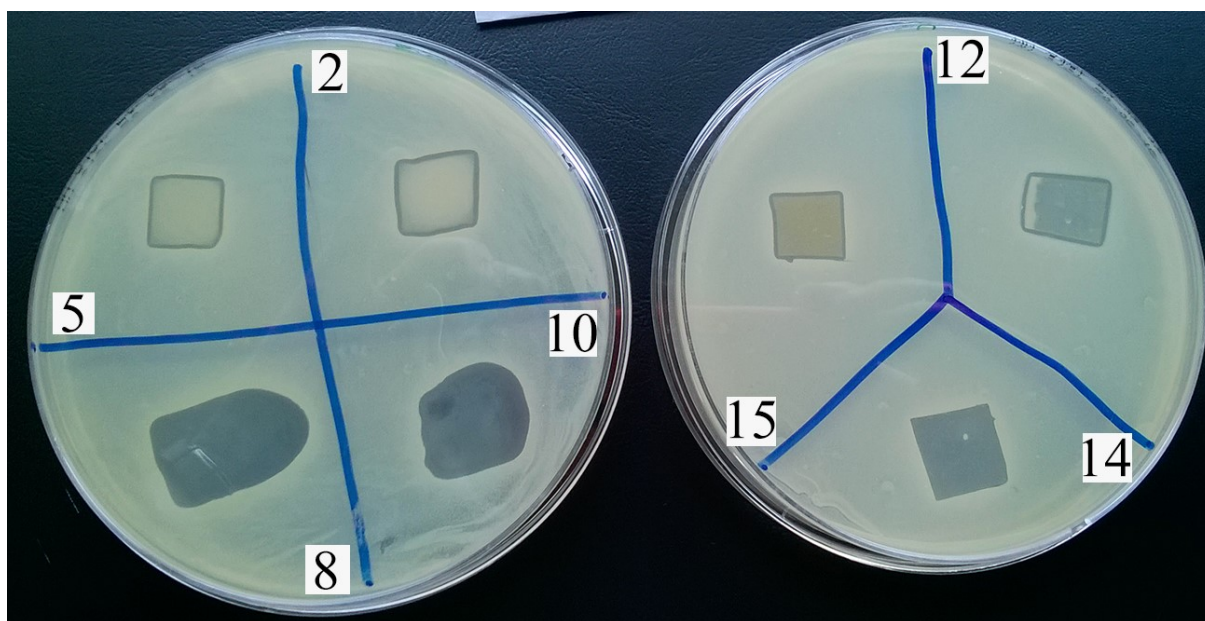
Na obrázku 14 je vzorek 8, který obsahuje uhlíkaté nanotrubičky. Byla pozorována rozvětvená struktura podobně jako u vzorku 5.



Obrázek 14: SEM snímek vzorku 8

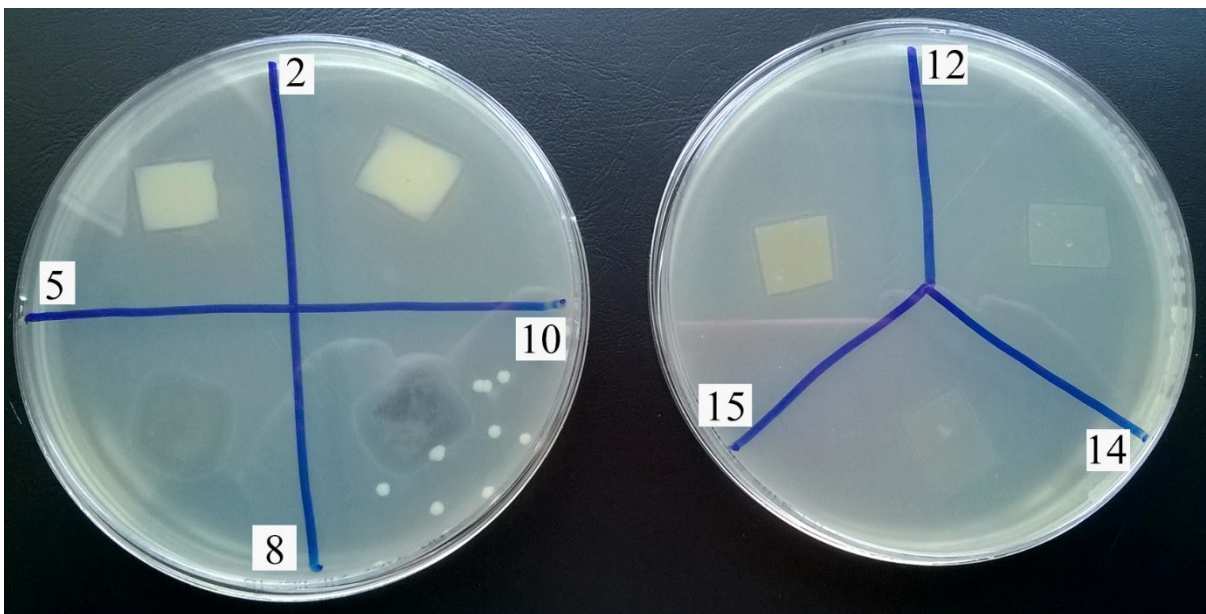
Antimikrobiálním testům byly z finanční náročnosti podrobeny pouze vzorky 2, 5, 8, 10, 12, 14 a 15. Ve všech případech byla pozorována jistá míra inhibice, přičemž v případě kmenů *S. aureus* a *E. faecalis* je nejlépe viditelná zóna inhibice. Toto uspořádání testu vychází z diskového difuzního testu, který se standardně používá pro testování antibiotik, ale s tím rozdílem, že v tomto případě nedochází k difuzi aktivní látky do okolí a proto nejsou inhibiční zóny tak patrné a není možné je měřit. Antibakteriální účinek testovaných materiálů se tedy omezuje na plochu vzorku a jeho bezprostřední okolí. Výsledky testů jsou znázorněny na obrázcích 15-18.

Vůči kmenu *S. aureus* (viz obrázek 15) vykazovaly výraznější antibakteriální aktivitu vzorky 2, 5, 12 a 15. U těchto vzorků je jasně viditelná zóna inhibice kolem vzorků. U vzorku 14 byla pozorována inhibice růstu pouze v případě místa kontaktu. U vzorků 8 a 10 došlo k narušení struktury vzorku a nejsou již viditelné hranice.



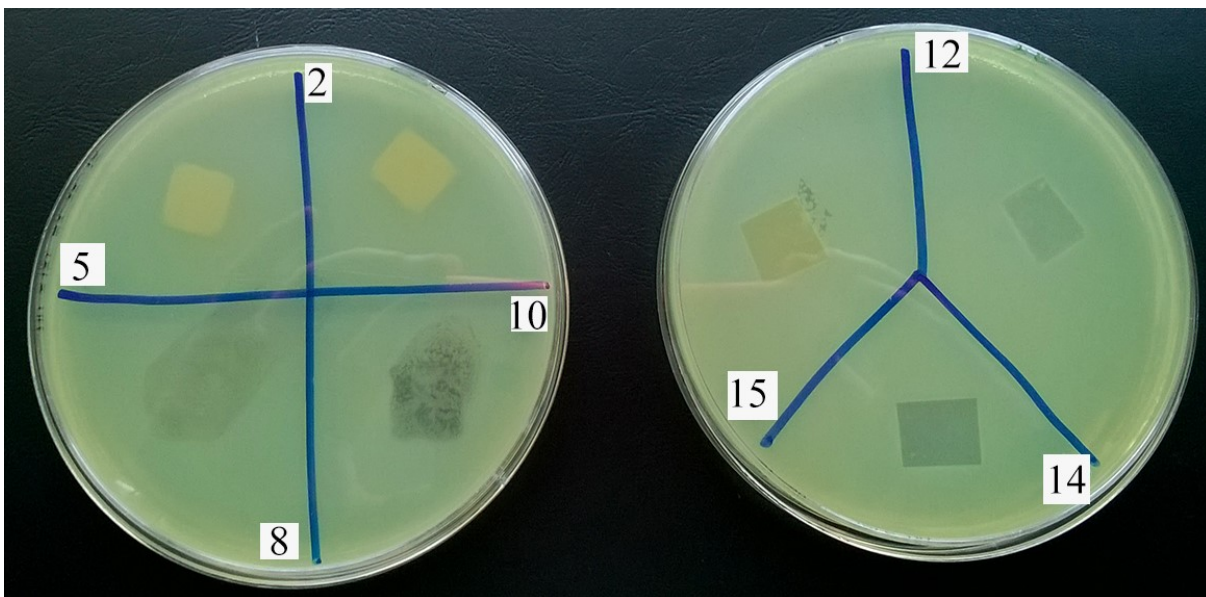
Obrázek 15: Kmen *S. aureus*

Vůči kmenu *E. faecalis* (viz obrázek 16) působí inhibičně nejlépe vzorky 2, 5, 12 a 15, u kterých je opět jasně viditelná inhibice. U vzorků 8 a 14 pozorujeme pouze minimální zónu inhibice. V místě vzorku 10 se vyskytuje kontaminace, kterou nelze vždy úplně eliminovat.

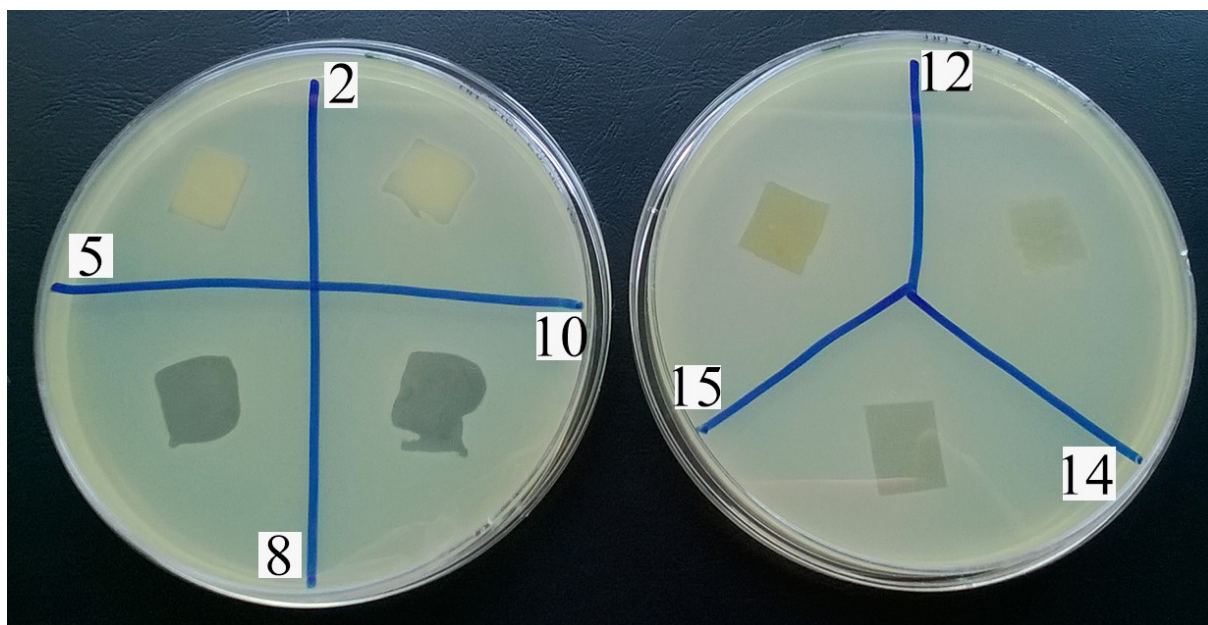


Obrázek 16: Kmen *E. faecalis*

V případě *P. aeruginosa* (viz obrázek 17) a *E. coli* (viz obrázek 18) došlo k natrávení vzorků 8 a 10 danými bakteriemi a není tedy možné definovat zónu inhibice. Bakterie se obecně živí organickým materiálem a je tedy velmi pravděpodobné, že enzymy, kterými disponují, se podílely na rozkladu struktury testovaného materiálu. U zbývajících vzorků byl pozorován účinek pouze v místě kontaktu.



Obrázek 17: Kmen *P. aeruginosa*



Obrázek 18: Kmen *E. coli*

Rozdílná aktivita vůči jednotlivým kmenům je dána jednak stavbou buněčné stěny dané bakterie (grampozitivní nebo gramnegativní) a dále tvarem buňky (tyčinky nebo koky). Z použitých kmenů je nejméně citlivý na změnu okolních podmínek a tedy nejodolnější kmen *P. aeruginosa*.

Nejlepší antimikrobiální aktivitu vykazovaly polymerní vrstvy s obsahem modifikovaného jílu. Účinnost vermikulitu modifikovaného HDP a HDTMA se téměř nelišila. V případě vzorků 14 a 15 byla pozorována větší aktivita vzorku 15, což je pravděpodobně způsobeno pětkrát větší koncentrací modifikovaného vermikulitu. U vzorků obsahujících uhlíkaté nanotrubičky byla pozorována velice špatná antimikrobiální aktivita, docházelo u nich k natrávení vzorků bakteriemi.

Závěr

V rámci bakalářské práce byla navržena příprava sedmnácti vzorků, celkem se podařilo připravit pouze 14 z nich. Příprava se nezdařila u vzorků z polyvinylacetátu a uhlíkatých nanotrubiček a 5% obsahem vermikulitu modifikovaného HDTMA, v těchto případech nedošlo k polymerizaci. U ostatních vzorků byla pozorována závislost mezi koncentrací modifikujících látek a mechanickými vlastnostmi polymerních vrstev. Čím větší byla koncentrace modifikujících látek, tím horší byly mechanické vlastnosti. Při použití uhlíkatých nanotrubiček docházelo k narušení homogenní struktury polymerních vrstev i při nejnižších koncentracích, trubičky se shlukovaly a tvořily ostrůvkovité struktury.

Nejlepší antimikrobiální vlastnosti vykazovaly vzorky s obsahem modifikovaného vermikulitu. U vzorků s modifikovanými uhlíkatými nanotrubičkami došlo k natrávení vzorků i přes obsah antimikrobiálních látek. To je pravděpodobně způsobeno tím, že bakterie obsahují enzymy štěpící organickou hmotu. Vzorky obsahující vermikulit dokonce vykazovaly jistou zónu inhibice, nedocházelo k projevu antimikrobiálních vlastností pouze v místě kontaktu. Při testech rozpustnosti však bohužel došlo k degradaci polymerních vrstev připravených z polyethylenoxidu.

Na snímcích ze světelného digitálního mikroskopu bylo možné pozorovat rozdílnou distribuci částic jílu a uhlíkatých nanotrubiček. Na snímcích ze skenovacího elektronového mikroskopu bylo možné pozorovat vliv modifikující látky na strukturu polymeru a detailněji studovat ukotvení částic ve vrstvě.

Připravené nanokompozitní polymerní vrstvy s obsahem modifikovaného vermikulitu vykazovaly dobré antimikrobiální vlastnosti. Zda by prodlužovaly životnost žlučových stentů by se prokázalo až po dlouhodobých antimikrobiálních testech. Před použitím těchto vrstev v praxi je nutné optimalizovat jejich mechanické vlastnosti, maximalizovat antimikrobiální vlastnosti a vyvinout metodiku modifikace žlučových stentů těmito polymerními vrstvami. Použití modifikovaných uhlíkatých nanotrubiček se ukázalo jako velice neefektivní. Před jejich použitím v praxi by bylo nutné zlepšit jejich antimikrobiální vlastnosti. Toho by bylo možné dosáhnout změnou postupu jejich modifikace a změnou postupu přípravy nanokompozitních vrstev.

Literatura

- [1] STRAZZABOSCO, Mario a Luca FABRIS. Functional Anatomy of Normal Bile Ducts. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology* [online]. 2008, **291**(6), 653-660 [cit. 2016-02-20]. DOI: 10.1002/ar.20664. ISSN 19328486. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ar.20664>
- [2] MAHADEVAN, Vishy. Anatomy of the gallbladder and bile ducts. *Surgery (Oxford)* [online]. 2014, , - [cit. 2016-02-20]. DOI: 10.1016/j.mpsur.2014.10.003. ISSN 02639319. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0263931914002087>
- [3] Anatomy of the biliary tree. [Online]. [cit. 2016-02-20]. Dostupné z: <<http://gallstoneflush.com/images/biliary%20tract.JPG>>.
- [4] Overview of Gallbladder and Bile Duct Disorders. [Online]. [cit. 2016-05-06]. Dostupné z: <<http://www.merckmanuals.com/home/liver-and-gallbladder-disorders/gallbladder-and-bile-duct-disorders/overview-of-gallbladder-and-bile-duct-disorders>>.
- [5] What is biliary obstruction. [Online]. [cit. 2016-05-06]. Dostupné z: <<http://www.healthline.com/health/bile-duct-obstruction#Overview1>>.
- [6] PFAU, Patrick R., Douglas K. PLESKOW, Subhas BANERJEE, et al. Pancreatic and biliary stents. *Gastrointestinal Endoscopy* [online]. 2013, **77**(3), 319-327 [cit. 2016-02-20]. DOI: 10.1016/j.gie.2012.09.026. ISSN 00165107. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016510712027538>
- [7] DUMONCEAU, J.-M., D. HERESBACH, J. DEVIÈRE, G. COSTAMAGNA, U. BEILENHOF a A. RIPHAUS. Biliary stents: models and methods for endoscopic stenting. *Endoscopy* [online]. 2011, **43**(07), 617-626 [cit. 2016-05-06]. DOI: 10.1055/s-0030-1256315. ISSN 0013-726x. Dostupné z: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0030-1256315>
- [8] CIPOLLETTA, L., G. ROTONDANO, R. MARMO a M.A. BIANCO. Endoscopic palliation of malignant obstructive jaundice: An evidence-based review. *Digestive and Liver Disease* [online]. 2007, **39**(4), 375-388 [cit. 2016-03-16]. DOI: 10.1016/j.dld.2006.12.016. ISSN 15908658. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1590865806006499>

- [9] KWON, Chang-Il, Kwang Hyun KO, Ki Baik HAHM a Dae Hwan KANG. Functional Self-Expandable Metal Stents in Biliary Obstruction. *Clinical Endoscopy* [online]. 2013, **46**(5), 515- [cit. 2016-05-10]. DOI: 10.5946/ce.2013.46.5.515. ISSN 2234-2400. Dostupné z: <http://e-ce.org/journal/view.php?doi=10.5946/ce.2013.46.5.515>
- [10] LEVY, Michael J, Todd H BARON, Christopher J GOSTOUT, Bret T PETERSEN a Michael B FARNELL. Palliation of malignant extrahepatic biliary obstruction with plastic versus expandable metal stents: an evidence-based approach. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* [online]. 2004, **2**(4), 273-285 [cit. 2016-03-16]. DOI: 10.1016/S1542-3565(04)00055-2. ISSN 15423565. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1542356504000552>
- [11] ARHAN, Mehmet, Bülent ÖDEMIŞ, Erkan PARLAK, İbrahim ERTUĞRUL a Ömer BAŞAR. Migration of biliary plastic stents: experience of a tertiary center. *Surgical Endoscopy* [online]. 2009, **23**(4), 769-775 [cit. 2016-03-16]. DOI: 10.1007/s00464-008-0067-x. ISSN 0930-2794. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00464-008-0067-x>
- [12] DONELLI, Gianfranco, et al. Plastic biliary stent occlusion: factors involved and possible preventive approaches. *Clinical medicine & research*, 2007, 5.1: 53-60.
- [13] ZHANG, Hongjun, Tat-kin TSANG a Christy A JACK. Bile glycoprotein mucin in sludge occluding biliary stent. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* [online]. 2003, **142**(1), 58-65 [cit. 2016-04-06]. DOI: 10.1016/S0022-2143(03)00087-8. ISSN 00222143. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022214303000878>
- [14] LEUNG, Joseph W., Yan Lei LIU, Taddese DESTA, Eric LIBBY, John F. INCIARDI a Kan LAM. Is there a synergistic effect between mixed bacterial infection in biofilm formation on biliary stents? *Gastrointestinal Endoscopy* [online]. 1998, **48**(3), 250-257 [cit. 2016-04-06]. DOI: 10.1016/S0016-5107(98)70186-5. ISSN 00165107. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016510798701865>
- [15] WEICKERT, U, F WIESEND, T SUBKOWSKI, A EICKHOFF a G REISS. Optimizing biliary stent patency by coating with hydrophobin alone or hydrophobin and antibiotics or heparin: an in vitro proof of principle study. *Advances in Medical Sciences* [online].

2011, **56**(2), 138-144 [cit. 2016-02-20]. DOI: 10.2478/v10039-011-0026-y. ISSN 18961126.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1896112614601309>

[16] WESSELS, JGH. Hydrophobin Genes Involved in Formation of Aerial Hyphae and Fruit Bodies in *Schizophyllum*. *THE PLANT CELL ONLINE* [online]. **3**(8), 793-799 [cit. 2016-02-20]. DOI: 10.1105/tpc.3.8.793. ISSN 10404651. Dostupné z: <http://www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.3.8.793>

[17] JANSEN, Bernd, Louis P. GOODMAN a Diana RUITEN. Bacterial adherence to hydrophilic polymer-coated polyurethane stents. *Gastrointestinal Endoscopy* [online]. 1993, **39**(5), 670-673 [cit. 2016-02-25]. DOI: 10.1016/S0016-5107(93)70220-5. ISSN 00165107. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016510793702205>

[18] CETTA, ROBERTO RAPPUOLI, GIULIA MON, Francesco. New Biliary Endoprosthesis Less Liable to Block in Biliary Infections: Description and In Vitro Studies. *The European Journal of Surgery* [online]. 1999-9-17, **165**(8), 782-785 [cit. 2016-02-25]. DOI: 10.1080/11024159950189582. ISSN 1102-4151. Dostupné z: <http://journalsonline.tandf.co.uk/Index/10.1080/11024159950189582>

[19] SEITZ, Uwe, Andreas BLOCK, Ann-Christina SCHAEFER, et al. Biliary Stent Clogging Solved by Nanotechnology? In Vitro Study of Inorganic-Organic Sol-Gel Coatings for Teflon Stents. *Gastroenterology* [online]. 2007, **133**(1), 65-71 [cit. 2016-02-25]. DOI: 10.1053/j.gastro.2007.04.006. ISSN 00165085. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508507007354>

[20] COSTAMAGNA, G., M. MUTIGNANI, V. PERRI, A. ZAMBELLI, F. De GRAZIS, A. FOCO, A. GARBARINI a L. GHEZZO. A randomized trial of hydrophilic hydromer-coated polyurethane endoscopic stents VS uncoated stents in malignant biliary strictures. *Gastrointestinal Endoscopy* [online]. 1997, **45**(4), AB127- [cit. 2016-02-25]. DOI: 10.1016/S0016-5107(97)80412-9. ISSN 00165107. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016510797804129>

[21] A Prospective Randomized Study of Hydrophilic Polymer-Coated Polyurethane Versus Polyethylene Stents in Distal Malignant Biliary Obstruction. *Endoscopy* [online]. 2003, **35**(6),

478-482 [cit. 2016-02-25]. DOI: 10.1055/s-2003-39666. ISSN 0013-726x. Dostupné z: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-2003-39666>

[22] LEE, Dong Ki, Hyun Soo KIM, Kyung-Sik KIM, et al. The effect on porcine bile duct of a metallic stent covered with a paclitaxel-incorporated membrane. *Gastrointestinal Endoscopy* [online]. 2005, **61**(2), 296-301 [cit. 2016-02-25]. DOI: 10.1016/S0016-5107(04)02570-2. ISSN 00165107. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016510704025702>

[23] SUK, Ki Tae, Jae Woo KIM, Hyun Soo KIM, et al. Human application of a metallic stent covered with a paclitaxel-incorporated membrane for malignant biliary obstruction: multicenter pilot study. *Gastrointestinal Endoscopy* [online]. 2007, **66**(4), 798-803 [cit. 2016-02-25]. DOI: 10.1016/j.gie.2007.05.037. ISSN 00165107. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016510707020949>

[24] YU, Qian, Zhaoqiang WU a Hong CHEN. Dual-function antibacterial surfaces for biomedical applications. *Acta Biomaterialia* [online]. 2015, **16**, 1-13 [cit. 2016-03-27]. DOI: 10.1016/j.actbio.2015.01.018. ISSN 17427061. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742706115000288>

[25] GOTTENBOS, Bart, Henny C VAN DER MEI, Flip KLATTER, Paul NIEUWENHUIS a Henk J BUSSCHER. In vitro and in vivo antimicrobial activity of covalently coupled quaternary ammonium silane coatings on silicone rubber. *Biomaterials* [online]. 2002, **23**(6), 1417-1423 [cit. 2016-03-27]. DOI: 10.1016/S0142-9612(01)00263-0. ISSN 01429612. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961201002630>

[26] SCHLENOFF, Joseph B. Zwitteration: Coating Surfaces with Zwitterionic Functionality to Reduce Nonspecific Adsorption. *Langmuir* [online]. 2014, **30**(32), 9625-9636 [cit. 2016-03-27]. DOI: 10.1021/la500057j. ISSN 0743-7463. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la500057j>

[27] HEJAZI, Iman, Gity Mir Mohamad SADEGHI, Seyed Hassan JAFARI, Hossein Ali KHONAKDAR, Javad SEYFI, Matthias HOLZSCHUH a Frank SIMON. Transforming an intrinsically hydrophilic polymer to a robust self-cleaning superhydrophobic coating via carbon nanotube surface embedding. *Materials & Design* [online]. 2015, **86**, 338-346 [cit. 2016-03-

27]. DOI: 10.1016/j.matdes.2015.07.092. ISSN 02641275. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S026412751530157X>

[28] LIN, Baofeng, Yaguang LUO, Zi TENG, Boce ZHANG, Bin ZHOU a Qin WANG. Development of silver/titanium dioxide/chitosan adipate nanocomposite as an antibacterial coating for fruit storage. *LWT - Food Science and Technology* [online]. 2015, **63**(2), 1206-1213 [cit. 2016-04-28]. DOI: 10.1016/j.lwt.2015.04.049. ISSN 00236438. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002364381500331X>

[29] ONISHI, Hiraku a Yoshiharu MACHIDA. Biodegradation and distribution of water-soluble chitosan in mice. *Biomaterials* [online]. 1999, **20**(2), 175-182 [cit. 2016-04-28]. DOI: 10.1016/S0142-9612(98)00159-8. ISSN 01429612. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961298001598>

[30] CARLSON, C., S. M. HUSSAIN, A. M. SCHRAND, L. K. BRAYDICH-STOLLE, K. L. HESS, R. L. JONES a J. J. SCHLAGER. Unique Cellular Interaction of Silver Nanoparticles: Size-Dependent Generation of Reactive Oxygen Species. *The Journal of Physical Chemistry B* [online]. 2008, **112**(43), 13608-13619 [cit. 2016-03-01]. DOI: 10.1021/jp712087m. ISSN 1520-6106. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp712087m>

[31] GUO, Liya, Weiyong YUAN, Zhisong LU a Chang Ming LI. Polymer/nanosilver composite coatings for antibacterial applications. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2013, **439**, 69-83 [cit. 2016-03-01]. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2012.12.029. ISSN 09277757. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092777571200893X>

[32] CHALOUPKA, Karla, Yogeshkumar MALAM a Alexander M. SEIFALIAN. Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications. *Trends in Biotechnology* [online]. 2010, **28**(11), 580-588 [cit. 2016-03-01]. DOI: 10.1016/j.tibtech.2010.07.006. ISSN 01677799. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167779910001228>

[33] SHRIVASTAVA, Siddhartha, Tanmay BERA, Arnab ROY, Gajendra SINGH, P RAMACHANDRARAO a Debabrata DASH. Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. *Nanotechnology* [online]. 2007, **18**(22), 225103- [cit.

2016-03-01]. DOI: 10.1088/0957-4484/18/22/225103. ISSN 0957-4484. Dostupné z: <http://stacks.iop.org/0957-4484/18/i=22/a=225103?key=crossref.c7262c016de5476a6cca9b14e7b1dd>

[34] CHOI, Okkyoung, Kathy Kanjun DENG, Nam-Jung KIM, Louis ROSS, Rao Y. SURAMPALLI a Zhiqiang HU. The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. *Water Research* [online]. 2008, **42**(12), 3066-3074 [cit. 2016-03-01]. DOI: 10.1016/j.watres.2008.02.021. ISSN 00431354. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0043135408000961>

[35] CHARNLEY, Mirren, Marcus TEXTOR a Canet ACIKGOZ. Designed polymer structures with antifouling–antimicrobial properties. *Reactive and Functional Polymers* [online]. 2011, **71**(3), 329-334 [cit. 2016-03-01]. DOI: 10.1016/j.reactfunctpolym.2010.10.013. ISSN 13815148. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1381514810001872>

[36] GOYAL, Rajendra N. a Sunita BISHNOI. Effect of single walled carbon nanotube–cetyltrimethyl ammonium bromide nanocomposite film modified pyrolytic graphite on the determination of betamethasone in human urine. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2010, **77**(2), 200-205 [cit. 2016-04-07]. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2010.01.024. ISSN 09277765. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776510000640>

[37] AROKE, U.; EL-NAFATY, U. XRF, XRD and FTIR properties and characterization of HDTMA-Br surface modified organo-kaolinite clay. *International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering*, 2014, 4.4: 817-825